



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Detección de sustancias antimicrobianas a partir de Staphylococcus de diferentes especies. Espectro de actividad.

Autor/es

DIEGO GRECA OTEO

Director/es

CARMEN TORRES MANRIQUE y MIRIAM ZARAZAGA CHAMORRO ,

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2017-18



***Detección de sustancias antimicrobianas a partir de Staphylococcus de diferentes especies. Espectro de actividad.***, de DIEGO GRECA OTEO (publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

## **Trabajo de Fin de Grado**

**Detección de sustancias antimicrobianas a partir de  
*Staphylococcus* de diferentes especies. Espectro de actividad.**

**Detection of antimicrobial substances from  
*Staphylococcus* of different species. Spectrum of activity.**

Autor:

*Diego Greca Oteo*

Tutor/es:

Carmen Torres Manrique y Myriam Zarazaga Chamorro

**GRADO:**

**Grado en Química**



**AÑO ACADÉMICO: 2017/2018**

# ÍNDICE

Lista de abreviaciones .....	3
Resumen .....	5
Abstract .....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1. Descubrimiento de los antibióticos y problemática de la resistencia a los mismos .....	7
1.2. El género <i>Staphylococcus</i> .....	8
1.2.1. <i>Staphylococcus</i> coagulasa positivos .....	8
1.2.2. <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos .....	9
1.3. Bacteriocinas .....	10
1.3.1. Clasificación fisicoquímica de las bacteriocinas .....	10
1.3.2. Propiedades de las bacteriocinas .....	13
1.3.3. Mecanismos de acción de las bacteriocinas .....	13
1.4. Bacteriocinas en <i>Staphylococcus</i> .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	18
3.1. Cepas bacterianas utilizadas .....	18
3.2. Aislamiento de cepas y condiciones de cultivo .....	20
3.3. Verificación de las identificaciones de las cepas mediante MALDI-TOF .....	21
3.4. Screening de producción de sustancias antimicrobianas en medio sólido por el método “spot in the lawn” .....	22
3.5. Análisis de la producción y detección de producción de sustancias antimicrobianas en medio líquido .....	24
3.6. Extracción de ADN .....	26
3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	26
3.8. Electroforesis en gel de agarosa .....	28
4. RESULTADOS .....	29
4.1. Ensayo 1 en medio sólido. <i>S. pseudintermedius</i> (y una cepa <i>S. lugdunensis</i> ) como microorganismo productor .....	29
4.2. Ensayo 2 en medio sólido. Especies <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos (SCoN) como microorganismos productores .....	31
4.3. Ensayo 3 en medio sólido. <i>S. delphini</i> como microorganismo indicador y <i>S. pseudintermedius</i> como especie productora .....	33
4.4. Ensayo 4. <i>S. delphini</i> como microorganismo productor y <i>S. pseudintermedius</i> y <i>S. aureus</i> como indicadoras .....	36
4.5. Ensayo 5 en medio sólido. <i>S. pseudintermedius</i> como productor frente a <i>S. pseudintermedius</i> como indicador .....	38

4.6.	Ensayo 6. Detección de actividad antimicrobiana de la cepa <i>S. pseudintermedius</i> C8189 crecida en medio líquido .....	40
5.	DISCUSIÓN .....	44
6.	CONCLUSIONES .....	49
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	50

## LISTA DE ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANI	Identidad media de nucleótidos
ARN	Ácido ribonucleico
Asn	Asparagina
BHI	Brain Heart Infusion
C+	Control positivo
C-	Control negativo
Cys	Cisteína
° C	Grado centígrado
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
∅	Diámetro
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Gly	Glicina
h	Hora
kDa	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mA	Miliamperio
mm	Milímetro
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
min	Minuto
m/z	Masa/carga
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Micrococcus</i>
mL	Mililitro
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
PBP2a	Proteína de unión a penicilina modificada
PA	<i>Pediococcus acidilactici</i>
pI <sub>s</sub>	Punto isoeléctrico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RBS	Punto de unión ribosomal
RM	Resistente a meticilina
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SCoP	<i>Staphylococcus</i> coagulasa-positivo
SCoN	<i>Staphylococcus</i> coagulasa-negativo

SIG	Grupo de <i>S. intermedius</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SM	Sensible a meticilina
SARM	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
Tyr	Tirosina
TOF	Tiempo de vuelo
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
TBE	Tris/Ácido bórico/EDTA
V	Voltio
Val	Valina
Xaa	Aminoácido no específico

## RESUMEN

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos secretados por bacterias y que inhiben el crecimiento de otras bacterias sensibles. Las bacteriocinas se están postulando como una alternativa a los antibióticos, bien de forma aislada o combinada, ante la emergencia de bacterias multirresistentes a los antibióticos. En este trabajo se ha estudiado la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) en una colección de 43 cepas de *Staphylococcus*, tanto coagulasa positivos (*S. pseudintermedius* y *S. delphini*) como coagulasa negativos (de nueve especies diferentes). Para la detección de dicha producción, se ha usado una colección de 30 bacterias indicadoras de diferentes géneros/especies bacterianos y fenotipos de resistencia a antibióticos, así como la técnica de “spot in the lawn”. De las 14 cepas de *S. pseudintermedius* analizadas, se ha detectado la producción de bacteriocinas en 4 de ellas, siendo la cepa C8189 la que ha presentado un espectro de actividad más amplio. En este sentido, la cepa C8189 producía una bacteriocina con actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (2 de 4 cepas testadas, incluida una resistente a meticilina) y muy especialmente frente a *S. delphini* (las 12 cepas testadas) y *S. pseudintermedius* (las 9 cepas testadas). Sin embargo, la actividad frente a *Staphylococcus* coagulasa negativos fue escasa (1 cepa de las 19 testadas, correspondiente a la especie *S. sciuri*). No se evidenció producción de bacteriocinas en ninguna de las cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativas testadas (con la excepción de *S. lugdunensis*) ni en las cepas de *S. delphini*. Se analizó si la actividad antimicrobiana de C8189 podía ser secretada al medio extracelular para lo cual se analizó la actividad antimicrobiana en sobrenadantes del microorganismo sometido a distintos tratamientos (centrifugación, hervido, filtración y liofilización). Tras todos los ensayos se llega a la conclusión de que la actividad se detecta solo en el medio sólido y que probablemente la bacteriocina no se secreta al medio extracelular. Por otro lado, se analiza por PCR la presencia en la cepa C8189 del gen codificante de bacteriocina *bacSp222*, descrito recientemente en la especie *S. pseudintermedius*. Para ello, se diseñan cebadores para la detección del gen; por PCR se detecta un producto que podría ser compatible con *bacSp222*, pendiente de su confirmación por secuenciación. Por tanto, en este trabajo se ha detectado una cepa de *S. pseudintermedius* que podría tener un interés biotecnológico para el control de la colonización/infección por *Staphylococcus* coagulasa positivos en animales y humanos. En un futuro se procederá a la caracterización de la sustancia antimicrobiana de C8189 para determinar su posible aplicación en el ámbito biomédico y agroalimentario.



## ABSTRACT

Bacteriocins are antimicrobial peptides secreted by bacteria which inhibit the growth of other susceptible bacteria. In last years, bacteriocins are postulated as alternative to antibiotics, either alone or combined with other compounds, mainly due to the emergence of multidrug resistant microorganisms. In this work, it has been analysed the production of antimicrobial substances (bacteriocins) in a collection of 43 *Staphylococcus* strains, both coagulase-positive (*S. pseudintermedius*, and *S. delphini*) and coagulase-negative (of nine different species). For bacteriocin detection, 30 indicator bacteria were used (of different genera/species and antibiotic resistance phenotypes) and the “spot in the lawn” methodology. Of 14 *S. pseudintermedius* strains analysed, four of them were bacteriocin-producers, being strain *C8189* the one with the widest and stronger spectrum of antimicrobial activity. In this sense, strain *C8189* produces a bactericin with inhibitory activity against *S. aureus* (2 of 4 strains tested, including one methicillin-resistant), and more especially against *S. delphini* (all 12 strains tested) and *S. pseudintermedius* (all 9 strains tested, both methicillin-susceptible and methicillin-resistant). Nevertheless, the activity for coagulase-negative staphylococci was low (only one of the 19 strains tested, of *S. sciuri* species). It was not detected the production of bacteriocins in the coagulase-negative staphylococci tested (with the exception of *S. lugdunensis*) or in *S. delphini*. The antimicrobial activity of *C8189* was analysed to determine if it was secreted to the extracellular media. For this purpose, the antimicrobial activity was analysed in *C8189* supernatants after several treatments (centrifugation, boiling, filtration, lyophilization). After several assays, it was corroborated that *C8189* bactericin was not secreted to extracellular media. Moreover, the presence in *C8189* of the bacteriocin-encoding gene *bacSp222*, very recently described in *S. pseudintermedius*, was analysed by PCR in our strain, after designing specific primers from the DNA sequence of the gene. By PCR it was detected an amplicon that could correspond to *bacSp222*, but should be corroborated in the future by sequencing. In conclusion, in this work it has been detected a *S. pseudintermedius* strain that could have biotechnological interest for the control of colonization/infection by coagulase-positive staphylococci in animals and humans. The characterization of *C8189* bacteriocin should be carried out in the future to determine its potential application in biomedical and agrofood fields.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Descubrimiento de los antibióticos y problemática de la resistencia a los mismos

Alexander Fleming (1881-1955) descubrió casualmente en 1928 la penicilina, producida por el hongo *Penicillium notatum*, por contaminación de unas placas en las que estaba cultivando la bacteria *Staphylococcus aureus* produciéndose la inhibición de crecimiento de la misma. La penicilina fue el primer compuesto natural descubierto que presentaba actividad antimicrobiana. De este modo, en 1939, la penicilina triunfó a nivel industrial y se comenzó a emplear a nivel clínico a comienzos de la década de los años 40, suscitando el interés por la búsqueda de nuevos antibióticos.



**Figura 1.** Alexander Fleming trabajando con placas con *Penicillium notatum* [1]

El empleo a nivel clínico de los antibióticos supuso un gran descenso de la mortalidad a nivel mundial. Sin embargo, en 1947 las bacterias empezaron a exhibir mecanismos de resistencia a estos compuestos que empezaban a ser utilizados.

El uso, y en muchas ocasiones abuso de los antibióticos, no solo en humanos, sino también en animales (especialmente en animales de consumo), ha provocado una fuerte presión selectiva que ha causado la emergencia de nuevos mecanismos de resistencia. Como consecuencia, en los últimos años, se ha producido un incremento de bacterias resistentes en personas, y también en animales, alimentos y en su entorno. Asimismo, dichas bacterias resistentes pueden diseminarse con facilidad en el ambiente a través del aire, y del agua, pudiendo alcanzar cultivos próximos a los animales y permitiendo su incorporación en la cadena alimentaria, siendo el último perjudicado el ser humano.

Este alarmante incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos es, sin lugar a dudas, uno de los grandes problemas de la actualidad respecto a la salud pública ya que estos fármacos suponen una de las principales herramientas para controlar y tratar las infecciones bacterianas. Por tanto, la aparición y desarrollo de nuevas

cepas multirresistentes e incluso resistentes a todos los antibióticos conocidos hasta el momento se traduce en uno de los problemas para el bienestar animal y humano [2].

## **1.2. El género *Staphylococcus***

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram-positivos, catalasa-positivos, inmóviles y no esporulados. Son microorganismos mesófilos cuya temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 35 y 37°C, son anaerobios facultativos y presentan metabolismo respiratorio y fermentativo.

Existen 52 especies y 28 subespecies registradas hasta la fecha [3]. Estas bacterias se pueden clasificar en dos grupos en función de si expresan la enzima coagulasa: *Staphylococcus* coagulasa positivo (SCoP) y coagulasa negativo (SCoN). Dentro del grupo de SCoP, se encuentran las especies: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* y *S. hyicus*. Por otra parte, algunas de las especies pertenecientes al grupo de los SCoN son: *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. arlettae*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, y *S. xylosus*, entre otras.

### **1.2.1. *Staphylococcus* coagulasa positivos**

Algunas especies del género *Staphylococcus* producen una proteína denominada coagulasa que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina, es decir, permite la coagulación de la sangre. Esta proteína reacciona con la protrombina en la sangre originando un complejo llamado estafilotrombina y, transforma, mediante un mecanismo enzimático el fibrinógeno en un coagulo de fibrina, de manera que se asemeja a la acción de la trombina formada fisiológicamente.

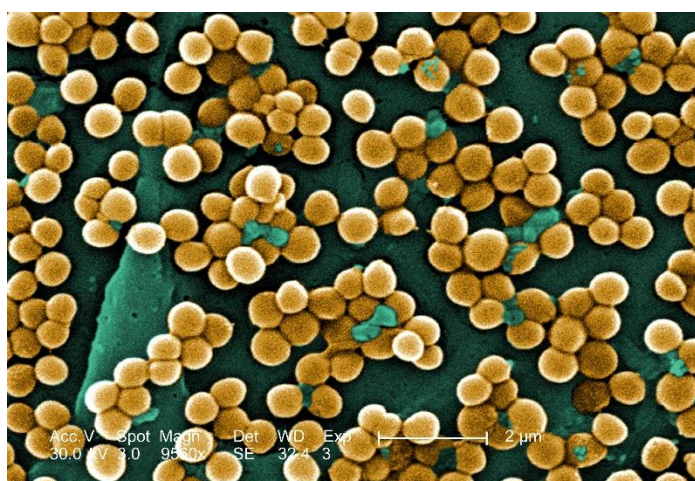
La presencia de esta enzima en las bacterias del género *Staphylococcus* dota a los SCoP de un carácter más patógeno que los SCoN ya que la coagulasa representa un importante factor de virulencia que permite la agregación y supervivencia de SCoP favoreciendo la formación de agregados bacterianos [2]. Entre las distintas especies SCoP las más representativas son:

- ***S. aureus***: este microorganismo puede colonizar el tracto nasofaríngeo de personas y de animales, pero también es un importante patógeno oportunista que puede causar una gran variedad de procesos infecciosos, desde infecciones en la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves como es el caso de bacteriemia y osteomielitis, entre otros. *S. aureus* también puede estar implicado en toxiinfecciones alimentarias. La patogénesis de una cepa particular de *S. aureus* está asociada al efecto combinado de factores extracelulares y toxinas junto a propiedades de la cepa como la adherencia, la formación de biofilm y la resistencia a la fagocitosis.

*S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) se ha convertido en un gran problema a nivel hospitalario en todo el mundo. Las cepas MRSA presentan resistencia a la mayor parte de los antibióticos beta-lactámicos por la producción de una

proteína de unión a penicilina modificada (PBP2a) que posee baja afinidad por los beta-lactámicos. Además, las cepas MRSA con frecuencia poseen mecanismos de resistencia para otras familias de antibióticos y suponen un problema clínico cuando están implicadas en procesos infecciosos [4].

- ***S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*:** *S. intermedius* y *S. delphini* fueron localizados por primera vez en animales en 1976 y 1988, respectivamente, y durante los últimos años muchas cepas aisladas e identificadas como *S. intermedius* debido a sus características fenotípicas se han reclasificado mediante el uso de técnicas moleculares. Esta nueva clasificación denominada grupo de *S. intermedius* (SIG) engloba tres especies coagulasa positivos (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*) los cuales pueden colonizar distintos animales y también pueden estar implicados en infecciones. *S. pseudintermedius* es colonizador habitual en el perro (y en menor medida en gatos), pero así mismo es patógeno responsable de la pioderma canina, y de otras infecciones de perros. Por otro lado, *S. intermedius* puede colonizar aves silvestres como las palomas, pudiendo ser causante asimismo de infecciones en dichos animales. Así mismo, *S. delphini* ha sido detectado en huéspedes como caballos y otros équidos como el asno, camellos, vacas, delfines o palomas. De manera análoga a *S. aureus*, las especies de SIG también presentan factores de virulencia incluyendo algunas enterotoxinas. El riesgo de transmisión zoonótica de estas especies no está claro excepto para el caso de *S. pseudintermedius*. En este sentido, la transmisión de cepas de *S. pseudintermedius* entre perros y sus dueños ya ha sido detectada y en ocasiones se ha asociado a infecciones en los mismos y se considera como una zoonosis [5][6][7].



**Figura 2.** Imagen de *S. aureus* obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM) [8]

### 1.2.2. ***Staphylococcus coagula negativos***

A pesar de que los SCoP presentan mayores ventajas de supervivencia, los SCoN son más numerosos y diversos y forman igualmente parte de la microbiota normal como hospedadores naturales y simbióticos en personas y en animales. Son así mismo

patógenos oportunistas, causando infecciones nosocomiales especialmente en pacientes con las defensas disminuidas. También se caracterizan por presentar fenotipos de multirresistencia a antibióticos dificultando considerablemente su tratamiento [2].

### **1.3. Bacteriocinas**

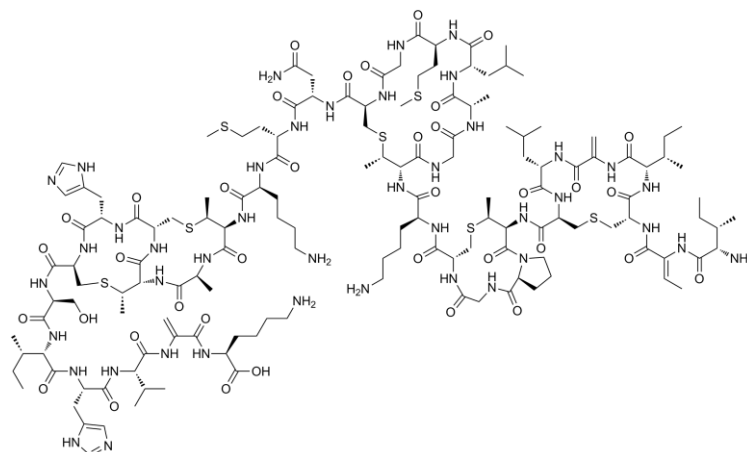
Muchas bacterias producen metabolitos importantes como ácidos, alcoholes, diacetales así como antibióticos en forma de moléculas proteicas inhibitorias denominadas bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos ribosomales o complejos proteicos de síntesis no ribosomal (como la lugdunina) secretados por distintos tipos de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacteriocinas tienen un campo de aplicación muy importante en agroalimentación como conservantes de alimentos y también en veterinaria como agentes profilácticos y terapéuticos. Además, en los últimos años existe un gran interés por su posible uso como antimicrobianos en terapéutica humana, tanto como agentes únicos o asociados a otros compuestos antimicrobianos.

#### **1.3.1. Clasificación fisicoquímica de las bacteriocinas**

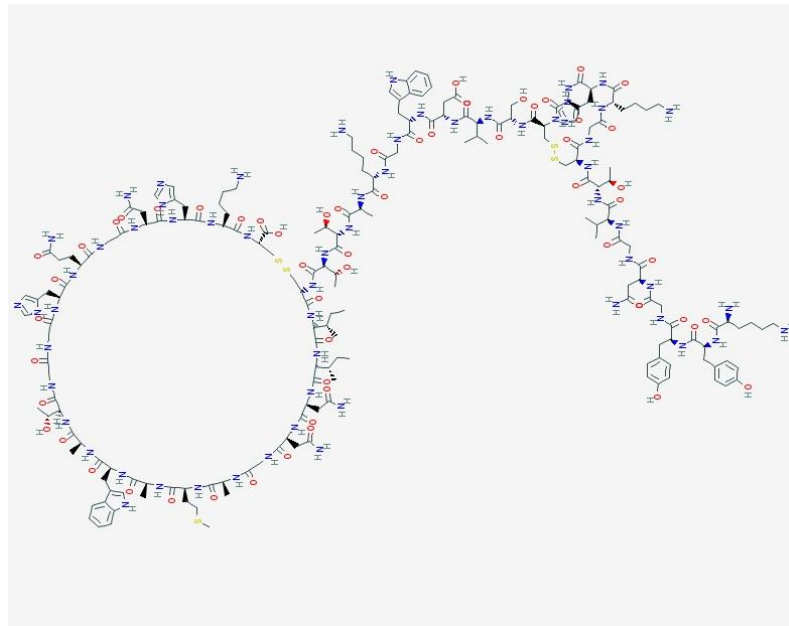
Las bacteriocinas pueden clasificarse en función de sus características bioquímicas y genéticas, presencia de enlaces disulfuro o monosulfuro, masa molecular, resistencia al calor, estabilidad frente a enzimas proteolíticas, presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales de aminoácidos y acción antimicrobiana. Según estas características se distinguen las siguientes clases de bacteriocinas:

- **Clase I:** son pequeños péptidos lantibióticos (<5 kDa, 19-37 aminoácidos) que contienen por lantionina y metilantionina en su estructura primaria. Estas bacteriocinas son termoestables y presentan modificaciones postraduccionales. Actúan sobre la estructura de la pared celular bacteriana, generalmente de bacterias Gram-positivas.
  - *Subclase Ia:* son péptidos elongados con carga positiva y matan a las bacterias mediante la formación de poros. A esta subclase pertenece el lantibiótico nisina (Fig. 3).
  - *Subclase Ib:* estas bacteriocinas, entre las que se encuentra la citolisina, son globulares, inflexibles y neutras o con carga negativa. Inhiben distintas enzimas catalíticas necesarias para completar procesos vitales de bacterias susceptibles.



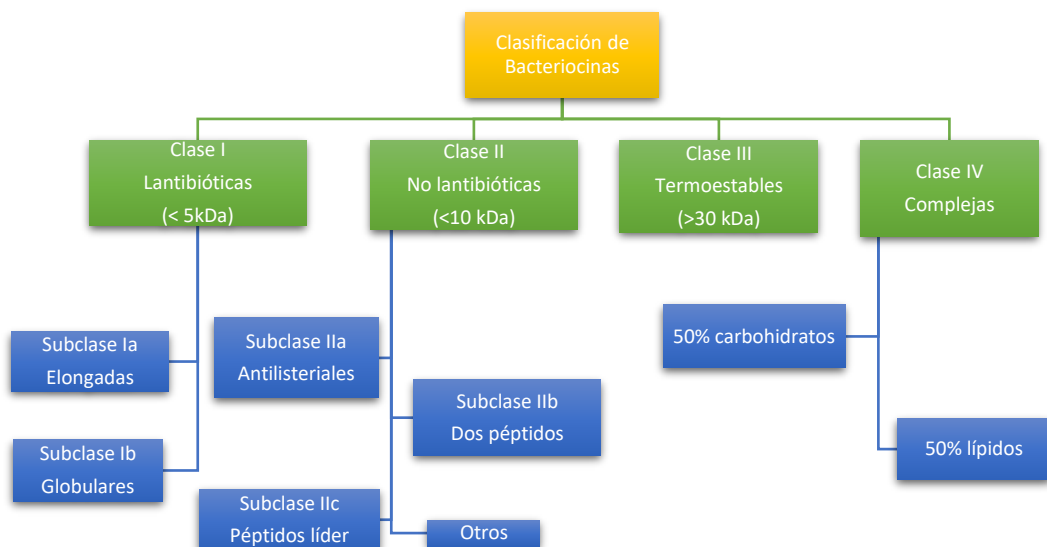
**Figura 3.** Estructura de la bacteriocina nisina perteneciente a la subclase Ia [9]

- **Clase II:** estas bacteriocinas son termoestables, pequeñas (<10 kDa), no lantibióticas, con puntos isoeléctricos (pIs) que oscilan entre 8,3 y 10, caracterizadas por la presencia de una secuencia hidrofílica N-terminal Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys.
  - **Subclase IIa:** a esta subclase pertenecen las bacteriocinas activas frente a *Listeria monocytogenes* (bacteriocinas antilisteriales) como la pediocina PA-1 (Fig. 4).
  - **Subclase IIb:** estas bacteriocinas requieren al menos dos péptidos diferentes para su actividad y, por lo general, actúan de manera sinérgica. Presentan poca o ninguna actividad cuando son testados individualmente. Un ejemplo característico son las plantaricinas, producidas por *L. plantarum* [10].
  - **Subclase IIc:** son péptidos pequeños y termoestables transportados por péptidos líder y se dividen en dos grupos: tiolbióticos y cistibióticos. Los tiolbióticos presentan dos unidades de cisteína mientras que los cistibióticos solo presentan una única unidad de cisteína. A esta subclase pertenecen la divergicina A y la acidocina B.



**Figura 4.** Estructura de la pediocina PA-1 perteneciente a la subclase IIa [11]

- **Clase III:** a esta clase pertenecen las bacteriocinas formadas por péptidos grandes como la lisostafina (>30 kDa). La clasificación se divide en bacteriocinas líticas termosensibles y bacteriocinas no líticas termosensibles. Las líticas son generalmente péptidos endopeptidasa que rompen la pared celular de la bacteria mediante un mecanismo enzimático.
- **Clase IV, bacteriocinas complejas o bacteriocinas cíclicas:** estas bacteriocinas complejas cuya estructura está formada en su mitad por carbohidratos o lípidos son sensibles a enzimas glicolíticas o lipolíticas. Entre ellas se encuentran la plantaricina S y la leuconocina S.



**Figura 5.** Clasificación de bacteriocinas en función de sus características fisicoquímicas (modificado de referencia [11]).

### 1.3.2. Propiedades de las bacteriocinas

La masa molecular de las bacteriocinas oscila entre 2 kDa y 300 kDa. Las lantibióticas y no lantibióticas se caracterizan por presentar forma catiónica a pH 7, están constituidas por unidades hidrofílicas/hidrofóbicas y su actividad se desarrolla en un rango de pH 3-7 debido a su estabilidad óptima (Fig. 6). Sin embargo, se ha observado inactividad irreversible de algunas bacteriocinas de esta clase a pH neutro.

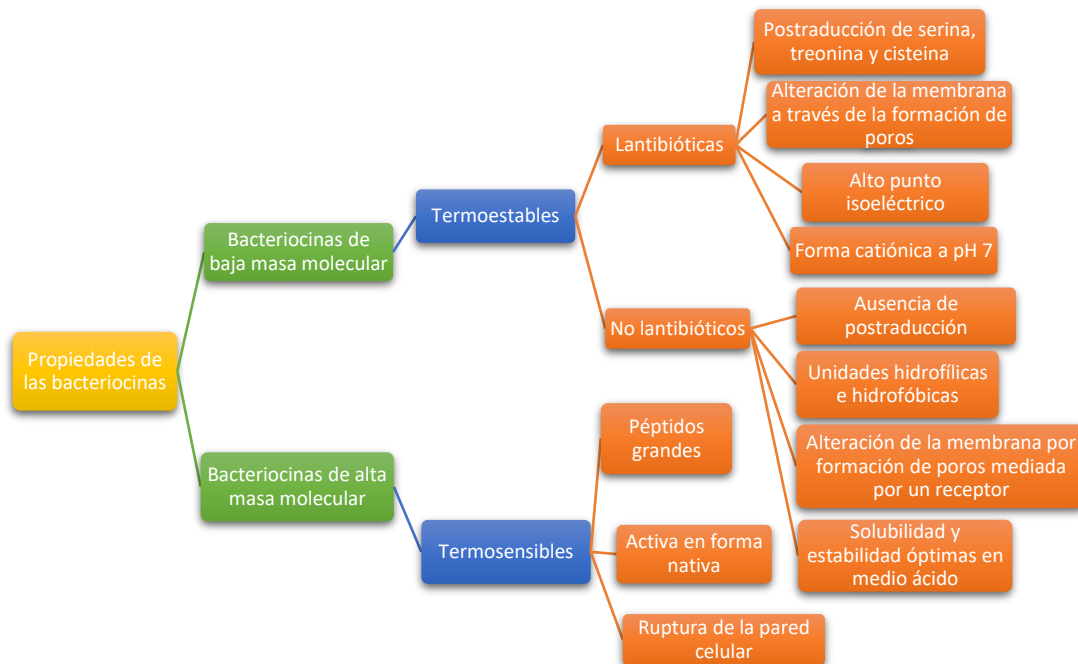


Figura 6. Propiedades de las bacteriocinas (modificado de referencia [11]).

### 1.3.3. Mecanismos de acción de las bacteriocinas

Las diferentes clases de bacteriocinas actúan mediante diversos mecanismos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, normalmente provocando la ruptura de la pared celular o inhibiendo la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos.

Las bacteriocinas se enlazan a los componentes de la pared celular como lípidos o la superficie molecular de puntos de enlace mediante receptores específicos o no específicos. Esto facilita la formación de poros o la ruptura celular directa provocando la muerte celular tras disiparse la fuerza protón-motriz del sistema bacteriano.

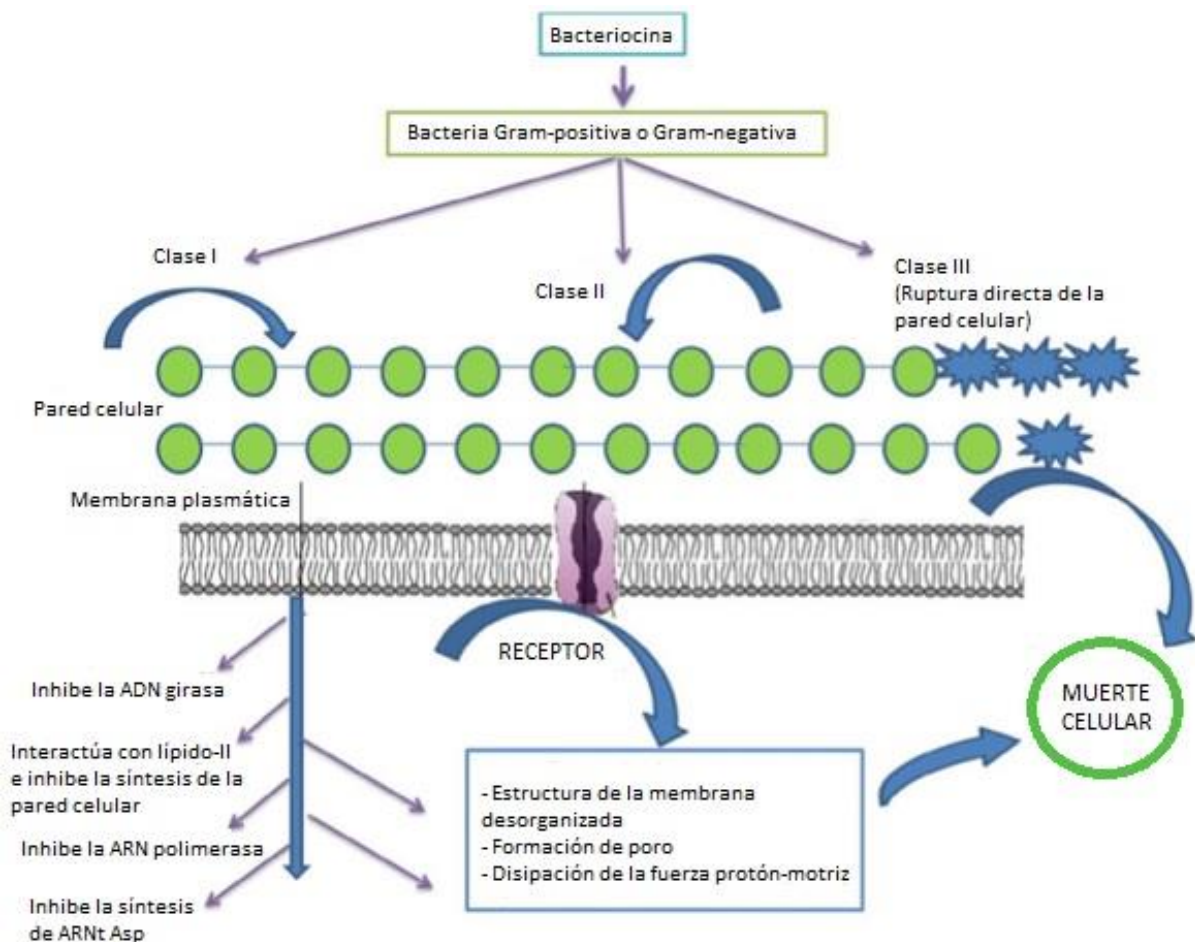
Sin embargo, la nisina ataca la membrana citoplasmática de bacterias Gram-negativas cuando se combina con EDTA debido al efecto quelato del EDTA con los componentes de la pared celular. Por otro lado, la mersacidina mata a las bacterias Gram-positivas impidiendo la síntesis de la pared celular y cuya actividad antibacteriana se incrementa con la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . La lisostafina mata a bacterias Gram-positivas de la especie *S. aureus* a través de la ruptura de la pared celular.



El mecanismo de ataque de la bacteriocina colicina contra bacterias Gram-negativas también se basa en la formación de poros en la membrana mientras que la pesticina, una bacteriocina de alta masa molecular (39,9 kDa), mata a la bacteria Gram-negativa *Yesinia* spp. y a *Escherichia coli* mediante la degradación de la pared celular rompiendo los enlaces glucosídicos de la misma.

Todos estos ejemplos demuestran el gran conocimiento que existe acerca de los mecanismos de ataque de bacteriocinas contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Muchas moléculas de la superficie de la pared celular como el sistema manosa fosfotransferasa o moléculas del tipo lípido II interactúan con las bacteriocinas de *clase I* (Fig. 7).

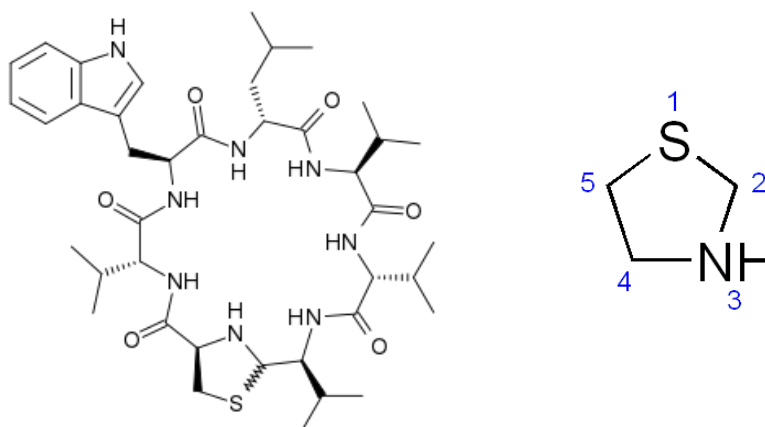
Los péptidos antimicrobianos de la *Subclase Ib* se distinguen por su naturaleza rígida y globular e inhiben la síntesis de ADN/ARN/proteínas o la pared celular por interacción con la membrana mediante atracción electrostática y/o por interacción con un componente de la membrana como el sistema manosa fosfotransferasa [11].



**Figura 7.** Mecanismo de acción de bacteriocinas de clase I, clase II y clase III (modificado de referencia [11]).

#### 1.4. Bacteriocinas en *Staphylococcus*

La gran mayoría de las infecciones bacterianas sistemáticas son causadas por patógenos facultativos, a menudo resistentes a los antibióticos, que colonizan las superficies del cuerpo humano. La colonización nasal por *S. aureus* predispone a la infección, pero los mecanismos que permiten o interfieren con la colonización de patógenos oportunistas son en gran parte desconocidos. De acuerdo a un estudio reciente, las cepas nasales de *S. lugdunensis* producen lugdunina, un nuevo antibiótico peptídico cíclico que contiene tiazolidina e inhibe la colonización de *S. aureus*. La lugdunina constituye un raro ejemplo de compuesto bioactivo no ribosómico sintetizado por bacterias asociadas al ser humano. Así mismo, es bactericida frente a los principales patógenos, eficaz en animales, y no es propenso a desarrollar resistencia frente a *S. aureus*. En particular, la colonización nasal humana de *S. lugdunensis* se ha asociado con una tasa significativamente reducida de colonización por *S. aureus*, lo que sugiere que las bacterias comensales productoras de lugdunina podrían ser valiosas para prevenir las infecciones provocadas por *Staphylococcus*. Además, la microbiota humana debería considerarse una fuente de nuevos antibióticos [12].



**Figura 8.** A la izquierda, estructura química de la lugdunina. A la derecha, estructura de la tiazolidina, componente de la lugdunina [13].

Por otro lado, *S. pseudintermedius* es una bacteria comensal común presente en la piel y en las superficies mucosas de animales domésticos. Sin embargo, se ha identificado recientemente como un patógeno oportunista importante para los seres humanos, en comparación con *S. aureus*. La situación epidemiológica se ha complicado debido al incremento de infecciones de *S. pseudintermedius* resistentes a la meticilina. En un estudio reciente, se ha descubierto un péptido, BacSp222, con características de bacteriocina y factores de virulencia. La cepa *S. pseudintermedius* 222 aislada de lesiones en la piel de perros es la responsable de secretar en gran cantidad el péptido BacSp222. Dicho péptido es bactericida para distintas especies de *Staphylococcus* (en concentraciones micromolares), así como también es termoestable y muy resistente a proteasas. Este péptido catiónico lineal de cincuenta aminoácidos está codificado en un plásmido y no presenta similitudes en

la secuencia respecto a otros péptidos o proteínas conocidas. Además, en mayores dosis exhibe actividad citotóxica hacia las células eucariotas [14].

```

TGAAAAAATAATACTTGTGGTAAATTTATATTATACAGCTGAAGCTGTATAATATAAAT
               -35                               -10

TTACGGAGGTTTTTGATTATGGCAGGATTACTACGTTTTCTTTAAGTAAAGGTCGCGCC
      RBS
               M  A  G  L  L  R  F  L  L  S  K  G  R  A

TTATACAATTGGGCAAAGAGTCATGTTGGAAAAGTTGGGAGTGGCTTAAATCAGGAGCT
L  Y  N  W  A  K  S  H  V  G  K  V  W  E  W  L  K  S  G  A

ACATATGAACAAATTAAAGAATGGATTGAAAACGCATTAGGTTGGAGATTAAGTCTTTAAG
T  Y  E  Q  I  K  E  W  I  E  N  A  L  G  W  R  *

TAAAAGTGGAGAGAAGTGTGCGGCTTCCTCCACTTTT
      →                               ←

```

**Figura 9.** Secuencia del gen estructural *bacSp222*. El comienzo y los codones terminales de la secuencia están marcados en negrita. Arriba, las regiones promotoras -35 y -10 y el punto de unión ribosomal (RBS) están subrayados. Abajo, las flechas inversas en horizontal indican la secuencia de terminación de la transcripción.

## 2. OBJETIVOS

- 1) Detectar la producción de sustancias antimicrobianas en una colección de cepas de *Staphylococcus* coagulasa-positivo y coagulasa-negativo.
- 2) Analizar el espectro de actividad inhibitoria frente a una amplia colección de bacterias indicadoras de diferentes grupos microbianos y con diferentes fenotipos de resistencia a antibióticos de interés.
- 3) Determinar la posible secreción al medio externo de las sustancias antimicrobianas producidas por bacterias seleccionadas por su perfil de actividad.
- 4) Analizar la posible presencia de genes relacionados con producción de bacteriocinas en las cepas productoras de las mismas.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas bacterianas utilizadas

Todas las cepas del género *Staphylococcus* que fueron empleadas en este estudio, tanto como indicadoras como potencialmente productoras, procedían de la colección de bacterias obtenidas de distintos orígenes por el grupo investigación de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja,

Las cepas de otras especies (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* y *Micrococcus luteus*) utilizadas como indicadoras, procedían de la American Type Culture Collection ATCC.

**Tabla 1.** Cepas estudiadas en este trabajo como potencialmente productoras de sustancias antimicrobianas.

PRODUCTORAS		
Nº cepa	Especie	Característica/Origen/Línea genética
<b>C8187</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina (SM) / humano
<b>C2912</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / perro
<b>C3930</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / perro
<b>C3007</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / perro
<b>C9954</b>	<i>S. lugdunensis</i>	Muestra clínica humana
<b>C8189</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina y ERY-R / clínica humana / ST241
<b>C8188</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina y MDR / clínica humana / ST521
<b>C8368</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina, TET-R / clínica humana / ST720
<b>C2915</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / humano
<b>C2382</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Resistente a meticilina (RM) / perro / ST71
<b>C3917</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina (SM) / humano
<b>X99</b>	<i>S. haemolyticus</i>	Aire de granja porcina
<b>X100</b>	<i>S. cohnii</i>	Aire de granja porcina
<b>X106</b>	<i>S. cohnii</i>	Aire de granja porcina
<b>X107</b>	<i>S. saprophyticus</i>	Aire de granja porcina
<b>X108</b>	<i>S. sciuri</i>	Aire de granja porcina
<b>X111</b>	<i>S. nepalensis</i>	Aire de granja porcina
<b>X114</b>	<i>S. arlettae</i>	Aire de granja porcina
<b>X117</b>	<i>S. cohnii</i>	Aire de granja porcina
<b>X98</b>	<i>S. epidermidis</i>	Aire de granja porcina
<b>X125</b>	<i>S. arlettae</i>	Aire de granja porcina
<b>X101</b>	<i>S. haemolyticus</i>	Aire de granja porcina
<b>X118</b>	<i>S. warneri</i>	Aire de granja porcina
<b>X104</b>	<i>S. epidermidis</i>	Aire de granja porcina
<b>X110</b>	<i>S. sciuri</i>	Aire de granja porcina
<b>X96</b>	<i>S. haemolyticus</i>	Aire de granja porcina

<b>X97</b>	<i>S. xylosus</i>	Aire de granja porcina
<b>C4473</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / asno
<b>C4471</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / perro
<b>C8478</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Perro (zoonosis)
<b>C8479</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Perro (zoonosis)
<b>C4464</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST219
<b>C4751</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST219
<b>C5672</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST12
<b>C5674</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST12
<b>C4469</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST12
<b>C4459</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST12
<b>C4458</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST218
<b>C4461</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST50
<b>C4465</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST220
<b>C4755</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST220
<b>C4752</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST13
<b>C9161</b>	<i>S. lugdunensis</i>	Clínica humana

**Tabla 2.** Cepas empleadas en este trabajo como indicadoras para la detección de sustancias antimicrobianas.

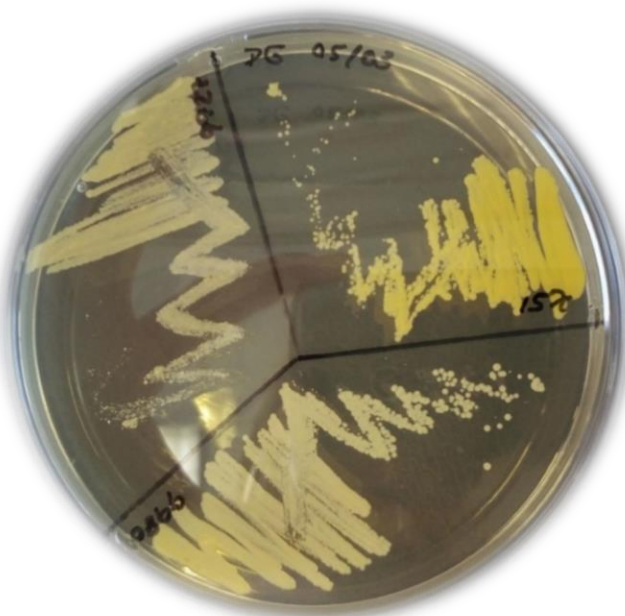
<b>INDICADORAS</b>		
<b>Nº cepa</b>	<b>Especie</b>	<b>Característica/Origen/Línea genética</b>
<b>C411</b>	<i>S. aureus</i>	ATCC29213
<b>C2663</b>	<i>S. epidermidis</i>	Resistente a meticilina linezolid/clínica humana
<b>C1570</b>	<i>MRSA St398</i>	Resistente a meticilina (SARM) /humana/ ST398
<b>C2709</b>	<i>S. haemolyticus</i>	Resistente a linezolid/clinica humana
<b>C9459</b>	<i>S. delphini</i>	buitre
<b>C137</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT4032
<b>C410</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212
<b>C7246</b>	<i>S. aureus</i>	Resistente a meticilina-mecC/clínica humana/ST1945-CC130
<b>C5313</b>	<i>S. aureus</i>	Resistente a meticilina (SARM)/ clínica humana/t067
<b>C9780</b>	<i>S. sciuri</i>	jabali
<b>C4464</b>	<i>S. delphini</i>	Asno/ST219
<b>C4751</b>	<i>S. delphini</i>	Asno/ ST219
<b>C5672</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST12
<b>C5674</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST12
<b>C4469</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST12
<b>C4459</b>	<i>S. delphini</i>	Asno / ST12
<b>C4458</b>	<i>S. delphini</i>	Asno/ ST218
<b>C4461</b>	<i>S. delphini</i>	Asno /ST50
<b>C4465</b>	<i>S. delphini</i>	Asno/ ST220
<b>C4755</b>	<i>S. delphini</i>	Asno/ ST220
<b>C4752</b>	<i>S. delphini</i>	Asno/ ST13
<b>C3468</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible meticilina/ perro

<b>C2381</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Resistente a meticilina / perro
<b>C8187</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / humano
<b>C3007</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / perro
<b>C3930</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Resistente a meticilina / perro
<b>C8188</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina y MDR/ clínica humana/ST521
<b>C8368</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina, TET-R / clínica humana/ST720
<b>C2915</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Sensible a meticilina / humano
<b>C2382</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	Resistente a meticilina (RM) / perro/ ST71

### 3.2. Aislamiento de cepas y condiciones de cultivo

Todas las cepas empleadas en este estudio se encontraban conservadas a -80°C en tubos de leche descremada (Difco). Los cultivos frescos de las cepas se obtuvieron por medio de siembras consecutivas en medio sólido (BHI agar) empleando material estéril y en zona aséptica gracias al mechero Bunsen.

- **Aislamiento por siembra en estría:** con un asa de siembra previamente esterilizada se sembraron cada una de las cepas con agotamiento en estría en una porción de la placa Petri para obtener, tras la incubación de las placas en la estufa a 37°C durante 24 horas, colonias aisladas de cultivo puro.



**Figura 10.** Aislamiento por siembra en estría en una placa Petri.

- **Siembra en extensión en medio sólido:** una vez obtenidas las colonias aisladas por siembra en estría, en nuevas placas de medio sólido BHI, se extendió con el asa de siembra una colonia de cada cepa seleccionada. Tras la incubación a 37°C durante 24 horas se obtuvieron cultivos frescos con los que se realizaron todos los estudios posteriores.





**Figura 11.** Cultivo por siembra en extensión superficial de seis cepas de la especie *S. pseudintermedius* que formaban parte del estudio.

### 3.3. Verificación de las identificaciones de las cepas mediante MALDI-TOF

Todas las cepas que formaban parte del estudio ya habían sido identificadas previamente por pruebas bioquímicas y moleculares (secuenciación del 16SrRNA y/o PCR-RFLP específicas). No obstante, en este trabajo se pretendió también familiarizarse con la técnica de MALDI-TOF para la identificación bacteriana. Algunas de las cepas fueron re-identificadas por esta técnica corroborando los resultados previamente obtenidos.

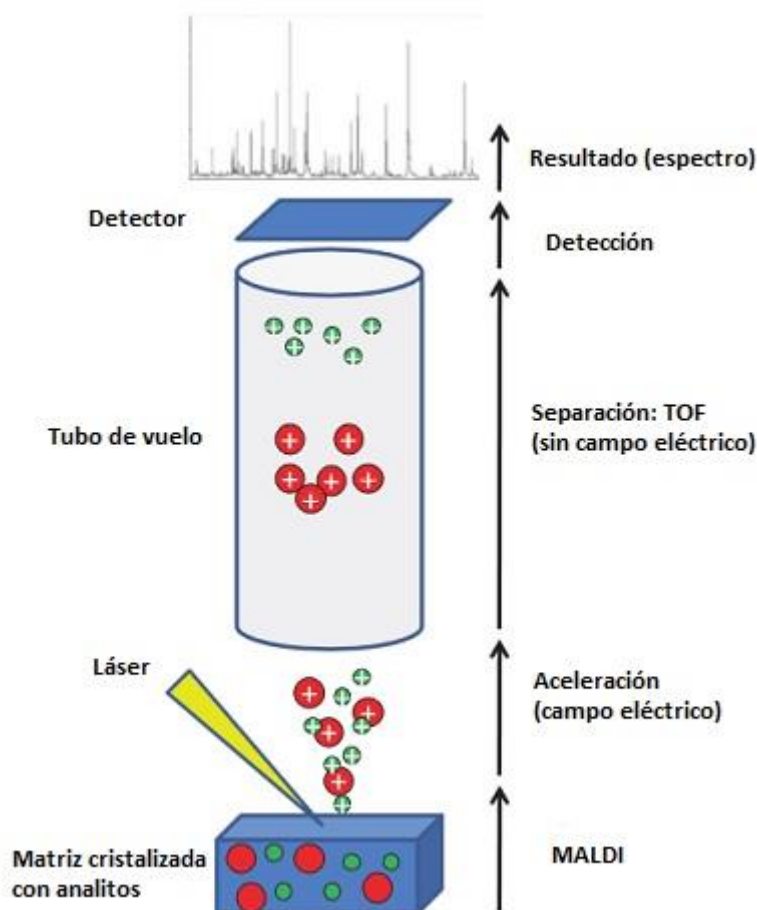
La ionización MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz) acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo) es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas, rápida, precisa y rentable, que permite la caracterización e identificación de microorganismos. Esta técnica genera huellas dactilares espectrales de masa característica, que son únicas para cada microorganismo y, por lo tanto, son ideales para una identificación microbiana precisa dentro de un género.

MALDI es una técnica de ionización suave que permite la ionización y vaporización de grandes biomoléculas no volátiles como proteínas intactas, así como TOF se ha utilizado para la detección de microorganismos intactos durante muchos años porque son adecuados para interactuar con la ionización por láseres pulsados y ofrecen la posibilidad de un análisis rápido.

La técnica MALDI-TOF se describe del siguiente modo: la muestra se mezcla con una matriz en una placa de metal conductora. Tras la cristalización de la matriz y el material microbiano, la placa de metal se introduce en el espectrómetro de masas y se bombardea con pulsos cortos de luz láser. Las moléculas desorbidas o ionizadas se aceleran a través de un campo eléctrico y se expulsan a través de un tubo de metal que se somete a vacío hasta que llegan a un detector, viajando los iones pequeños



con mayor velocidad que los iones grandes. Por lo tanto, los bioanalitos separados de acuerdo con su TOF generan un espectro de masas que está compuesto por picos de masa/carga ( $m/z$ ) con intensidades variables. El espectro se compara con una base de datos para la identificación a nivel de especie o género (Fig. 12) [13]



**Figura 12.** Descripción de la técnica MALDI-TOF (modificada de referencia [15]).

Se siguió el siguiente procedimiento en una pantalla de MALDI-TOF de 96 pocillos:

1. Se expandió homogéneamente en el pocillo correspondiente una pequeña porción de la cepa de bacteria que se quería identificar/verificar.
2. Se añadió 1  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico sobre el pocillo y se dejó secar.
3. Se añadió 1  $\mu\text{L}$  de matriz sobre el pocillo.

Los espectros obtenidos fueron analizados con el software Biotyper que permite la identificación del microorganismo por comparación con una base de datos de espectros bacterianos.

### **3.4. Screening de producción de sustancias antimicrobianas en medio sólido por el método “spot in the lawn”**

La técnica “spot in the lawn” consiste en enfrentar varios microorganismos productores (sembrados por picadura) con un microorganismo indicador (sembrado

en capa) con el objetivo de detectar halos de inhibición que indiquen la producción de sustancias antimicrobianas, como son las bacteriocinas.

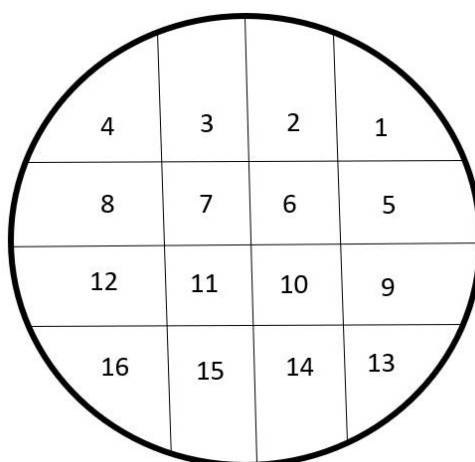
Este método fue el empleado en los cuatro experimentos realizados y para llevarlo a cabo, se prepararon los siguientes medios:

- Placas de medio sólido TSA (Tryptic Soy Agar, 15 mL) suplementado con 0,3% de extracto de levadura (yeast extract).
- Tubos de BHI líquido (BHI Broth) (5 mL)
- Tubos de medio semisólido TSB (Tryptic Soy Broth, 5 mL), suplementado con 0,7% de agar y 0,3% de extracto de levadura.

Todo el material empleado debe ser previamente esterilizado.

**Procedimiento:**

1. Sumergir los tubos de medio semisólido (TSB) en un baño a 90°C hasta la fusión completa del medio. De manera simultánea, realizar la suspensión de los diferentes microorganismos indicadores en medio líquido BHI (turbidez 0,5 MacFarland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonia/ml).
2. Una vez finalizadas todas las suspensiones, adicionar 10  $\mu$ L de cada suspensión de microorganismo indicador en los tubos de TSB (temperatura en torno a 40°C) con la micropipeta adecuada y agitar suavemente.
3. Verter los tubos de TSB con indicador en las placas de medio sólido TSA y dejar solidificar de tal manera que la capa con el microorganismo cubra homogéneamente la placa Petri.
4. Sembrar por picadura en las placas de medio sólido (TSA + TSB) los microorganismos productores (cultivos frescos obtenidos previamente en placas de medio sólido BHI). La siembra por picadura se realiza siguiendo la siguiente plantilla de referencia (Fig. 13) donde cada casilla se corresponde con un microorganismo potencialmente productor. Dependiendo del experimento, se utilizó mayor o menor número de casillas en función del número de microorganismos productores sembrados.



**Figura 13.** Esquema de la plantilla utilizada en la siembra por picadura del método “spot in the lawn”.

5. Finalmente, incubar las placas sembradas en la estufa a 37°C durante 24 h comprobando al día siguiente los resultados obtenidos.

Siguiendo esta metodología se realizaron cinco ensayos:

1. Ensayo 1 en medio sólido. *S. pseudintermedius* (y una cepa *S. lugdunensis*) como microorganismo productor.
2. Ensayo 2 en medio sólido. Especies *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCoN) como microorganismos productores.
3. Ensayo 3 en medio sólido. *S. delphini* como microorganismo indicador y *S. pseudintermedius* como especie productora.
4. Ensayo 4 en medio sólido. *S. delphini* como microorganismo productor y *S. pseudintermedius* y *S. aureus* como indicadoras.
5. Ensayo 5 en medio sólido. *S. pseudintermedius* como microorganismo productor frente a *S. pseudintermedius* como indicador.

### 3.5. Análisis de la producción y detección de producción de sustancias antimicrobianas en medio líquido

Una vez realizada la técnica de “spot in the lawn” y estudiados los espectros de actividad antimicrobiana de cada una de ellas, se seleccionaron un número limitado de cepas que presentaban mayores halos de inhibición frente a un mayor número de cepas y que pudieran ser las más productoras de bacteriocinas. También se seleccionaron cepas que, según los resultados obtenidos, podían considerarse como buenas indicadoras.

Con las cepas seleccionadas como productoras se analizó posteriormente si dichas bacteriocinas eran secretadas al medio extracelular o, por el contrario, permanecían dentro de la célula. Para ello, se determinó la detección de sustancias antimicrobianas en medio líquido y se emplearon distintos métodos:

- **Método de centrifugación y estabilidad a la temperatura:**

Se realizó la suspensión de las cepas productoras seleccionadas en 10 mL de TSB líquido y se dejaron crecer en la estufa durante 24 horas. De manera simultánea se esterilizaron criotubos para su uso posterior.

Del cultivo obtenido se preparó un eppendorf con 1 mL y se centrifugó a 1200 rpm durante 3 minutos.

El sobrenadante se subdividió en 2 eppendorfs, uno con 200  $\mu$ L y otro con 400  $\mu$ L. Para comprobar la presencia de actividad antimicrobiana se sembraron en placa cepas indicadoras y se perforaron pocillos sobre el agar utilizando una punta de pipeta como "sacabocados".

En dichos pocillos se inocularon 50  $\mu$ L de sobrenadante sometiendo las alícuotas a diferentes condiciones:

- La alícuota de 200  $\mu$ L se testó directamente sobre la placa con microorganismo indicador.
- La alícuota de 400  $\mu$ L se hirvió comprobando la actividad inhibitoria pasados 1 y 5 minutos.

Tras la incubación a 37°C durante 24 horas se analizó la formación de halos de inhibición.

- **Método de liofilización:**

Del cultivo obtenido en el apartado anterior se prepararon 4 eppendorfs con 1 mL cada uno sometiénolos a diferentes procesos:

- 2 eppendorfs se centrifugaron 3 minutos a 1200 rpm. Se recogió el sobrenadante y se juntó en un criotubo ( $\approx$  1mL).
- 2 eppendorfs se centrifugaron 3 minutos a 1200 rpm. Se recogió el sobrenadante, se hirvió 1 minuto y se juntó en un criotubo ( $\approx$  1mL).

El volumen del cultivo líquido restante se subdividió en alícuotas de volumen equivalente. Posteriormente, se centrifugaron las muestras 3 minutos a 1200 rpm y se recogió el sobrenadante. Finalmente, se juntó el sobrenadante, se filtró con filtro de 0,20  $\mu$ m (las bacterias tienen un diámetro de en torno a 10  $\mu$ m), se recogió el sobrenadante libre de células y se reunió en un criotubo.

Los criotubos se congelaron a -80°C y se liofilizaron (proceso de concentración) en un aparato denominado Bench Top Pro siguiendo las instrucciones indicadas (revisar bomba, drenado, engrasado de las gomas...).

Una vez obtenidos los criotubos liofilizados, se añadieron 100  $\mu$ L (dilución 1:10) de medio líquido TSB resuspendiendo el polvo (producto de liofilización) hasta obtener una disolución homogénea. A continuación, se colocaron discos

estériles sobre una placa Petri vacía sobre los que se aplicaron 25 µL de la disolución de material liofilizado. Finalmente, con el material completamente seco, se colocaron los discos sobre la placa inoculada con la bacteria indicadora a testar y se incubaron en la estufa a 37°C durante 24 horas.

Durante la realización de ambos métodos se tuvo que trabajar en condiciones especiales de manera que todo el material estuviera lo más estéril posible. El proceso de esterilización se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se prepararon bolas de algodón cubiertas de gasa.
- Se introdujeron las bolas de algodón en los criotubos sin tapón.
- Se envolvieron los tapones en papel de aluminio.
- Se introdujeron los criotubos en vasos de precipitados.
- Todo el material se esterilizó cubierto en papel de aluminio.

De este modo, para evitar cualquier tipo de contaminación se trabajó en una cámara de flujo laminar cuyo material requerido fue el siguiente:

- Pipeta de 1000 mL y puntas
- Gradilla para tubos y criotubos
- Tubos de 15 mL
- Bote de basura
- Pinzas para retirar el algodón
- Filtro
- Jeringuilla y aguja

### **3.6. Extracción de ADN**

El método seguido para la extracción de ADN de bacterias del género *Staphylococcus* y, en este caso, de las cepas de interés, se llevó a cabo del siguiente modo:

1. Se suspendió una colonia en 45 µL de H<sub>2</sub>O MiliQ y se añadieron 5 µL de lisostafina (vórtex).
2. Se incubó durante 10 minutos a 37°C.
3. Se añadieron 45 µL de H<sub>2</sub>O MiliQ, 150 µL de Tris HCl 0,1 M (pH 8) y 5 µL de proteinasa K (vórtex).
4. Se incubó durante 5 minutos a 100°C.
5. Se centrifugó durante 3 minutos a 1200 rpm.

### **3.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa se define como una técnica que amplifica *in vitro* una secuencia específica de ADN, obteniéndose millones de copias de la

secuencia original y cuyo fragmento amplificado se suele corresponder a la expresión de un gen específico. La reacción de PCR se realiza en un termociclador.

La técnica de PCR se empleó para averiguar si cinco cepas de la especie *S. pseudintermedius* seleccionadas contenían el gen que codificaba el péptido BacSp222, localizado en un plásmido de 14857 pb, descubierto recientemente como un péptido que presentaba características de bacteriocina en una cepa de *S. pseudintermedius* en lesiones de perros [14]. La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50  $\mu$ L.



**Figura 14.** Cubeta y gradilla con los componentes requeridos para la PCR.

**Tabla 3.** Reactivos empleados en la PCR para un volumen final de 50  $\mu$ L.

Componentes	Volumen ( $\mu$ L)
Cebador <i>forward</i>	1
Cebador <i>reverse</i>	1
Tampón de reacción	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTPs	1
BioTaq ADN polimerasa	0,3
ADN	10
Agua MiliQ estéril	30,2

Respecto a la Tabla 3, los cebadores empleados fueron sintetizados por Sigma Aldrich. Cada muestra de PCR contenía 40  $\mu$ L de mezcla (todos los componentes de la Tabla 1 salvo el ADN) y 10  $\mu$ L de ADN. Por otro lado, el agua MiliQ estéril se utilizó para ajustar el volumen final del control negativo.

Las secuencias de los cebadores empleados, las condiciones de amplificación y el tamaño del fragmento de ADN amplificado se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Secuencias nucleotídicas de cebadores y condiciones de amplificación del gen *bacSp222* según la referencia.

Primers (secuencia 5' → 3')	Componentes			Referencia (tamaño del amplicón)
<b>bacSp222</b>  F: GTCGCGCCTTATACAATTGGG R: GTAGCTCCTGATTTAAGCCACTCC	95°C	2 min	39 ciclos	Wladyka <i>et al.</i> , 2015 [12]  (70 pb)
	95°C	30 s		
	55°C	30 s		
	72°C	30 s		
	72°C	10 min	1 ciclo	

### 3.8. Electroforesis en gel de agarosa

Para separar los fragmentos de ADN amplificados se utilizaron geles de agarosa aplicando un campo eléctrico. Los geles se formaron añadiendo una disolución de agarosa, TBE 1X y Midori Green, compuesto que permite observar los fragmentos de ADN amplificados por intercalación en la doble hélice del ADN. Las muestras se cargaron en el gel mezclando 10 µL de producto de PCR y 2 µL de tampón de carga. A continuación, los geles se depositaron en la cubeta de electroforesis aplicando la siguiente corriente continua: 96 V, 120 mA, 100 W, 45 minutos. Finalmente, se visualizó el gel con luz ultravioleta y se fotografió el resultado con el captador de imágenes (Image Store 5000, UPV).

## 4. RESULTADOS

Durante todo el estudio se llevaron a cabo cinco ensayos que fueron planteados y desarrollados en función de los resultados que se iban obteniendo.

### 4.1. Ensayo 1 en medio sólido. *S. pseudintermedius* (y una cepa *S. lugdunensis*) como microorganismo productor

Se emplearon un total de 21 cepas procedentes de diferentes orígenes incluidas en la Tabla 5. Como microorganismos indicadores se utilizaron 10 cepas (8 del género *Staphylococcus*, 1 *Listeria monocytogenes* y 1 *Enterococcus faecalis*) y 11 como cepas potencialmente productoras (10 de la especie *S. pseudintermedius* y una *S. lugdunensis*).

**Tabla 5.** Número de cepa y especie de las diferentes cepas productoras e indicadoras correspondientes al ensayo 1.

PRODUCTORAS		INDICADORAS	
Nº cepa	Especie	Nº cepa	Especie
<b>C8187</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C411</b>	<i>S. aureus</i>
<b>C2912</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C2663</b>	<i>S. epidermidis</i>
<b>C3930</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C1570</b>	<i>S. aureus</i>
<b>C3007</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C2709</b>	<i>S. haemolyticus</i>
<b>C9954</b>	<i>S. lugdunensis</i>	<b>C9459</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C8189</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C137</b>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>C8188</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C410</b>	<i>E. faecalis</i>
<b>C8368</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C7246</b>	<i>S. aureus</i>
<b>C2915</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C5313</b>	<i>S. aureus</i>
<b>C2382</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C9780</b>	<i>S. sciuri</i>
<b>C3917</b>	<i>S. pseudintermedius</i>		

La actividad antimicrobiana en medio sólido de las cepas productoras se analizó mediante la técnica “spot in the lawn”. La interpretación de los resultados obtenidos consiste en observar y evaluar la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de las cepas productoras.



**Tabla 6.** Resultados de la actividad antimicrobiana de las cepas productoras medida como presencia o ausencia de halos de inhibición/producción de bacteriocinas del ensayo 1.

PRODUCTORAS	INDICADORAS									
Nº cepa/especie	C411 <i>S. aureus</i>	C2663 <i>S. epidermidis</i>	C1570 <i>S. aureus</i> - MR	C2709 <i>S. haemolyticus</i>	C9459 <i>S. delphini</i>	C137 <i>L. monocytogenes</i>	C410 <i>E. faecalis</i>	C7246 <i>S. aureus</i> - MR	C5313 <i>S. aureus</i> - MR	C9780 <i>S. sciuri</i>
<b>C8187</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C2912</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>C3930</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C3007</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C9954</b> <i>S. lugdunensis</i>	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>C8189</b> <i>S. pseudintermedius</i>	+	-	+	-	++	-	-	-	-	+
<b>C8188</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C8368</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C2915</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C2382</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C3917</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MR – Resistente a meticilina.

**Leyenda** (grado de producción de bacteriocinas):  
 ++ = Producción alta  
 + = Producción baja  
 - = Producción nula



**Figura 15.** Placa con bacteria indicadora C9459 (*S. delphini*) donde se observan halos de inhibición en las bacterias productoras C2912 y C8189 (*S. pseudintermedius*) y C9954 (*S. lugdunensis*). Placa con bacteria indicadora C2709 (*S. haemolyticus*) con ausencia de halos de inhibición.

#### 4.2. Ensayo 2 en medio sólido. Especies *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCoN) como microorganismos productores

En este segundo ensayo se estudiaron 16 cepas de diferentes especies de *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCoN) y se testaron como microorganismos productores frente a 8 cepas indicadoras del género *Staphylococcus* (tanto de especies SCoN como SCoP), una cepa *Listeria monocytogenes* y una cepa *Micrococcus luteus*. En la Tabla 7 se detallan las cepas incluidas en este experimento.

**Tabla 7.** Número de cepa y especie de las diferentes cepas productoras e indicadoras correspondientes al ensayo 2.

PRODUCTORAS		INDICADORAS	
Nº cepa	Especie	Nº cepa	Especie
X99	<i>S. haemolyticus</i>	C411	<i>S. aureus</i>
X100	<i>S. cohnii</i>	C2663	<i>S. epidermidis</i>
X106	<i>S. cohnii</i>	C9459	<i>S. delphini</i>
X107	<i>S. saprophyticus</i>	C137	<i>L. monocytogenes</i>
X108	<i>S. sciuri</i>	C2709	<i>S. haemolyticus</i>
X111	<i>S. nepalensis</i>	C157	<i>M. luteus</i>
X114	<i>S. arlettae</i>	C9980	<i>S. lugdunensis</i>
X117	<i>S. cohnii</i>	C9927	<i>S. lugdunensis</i>
X98	<i>S. epidermidis</i>	C8189	<i>S. pseudintermedius</i>
X125	<i>S. arlettae</i>	C2912	<i>S. pseudintermedius</i>
X101	<i>S. haemolyticus</i>		
X118	<i>S. warneri</i>		
X104	<i>S. epidermidis</i>		
X110	<i>S. sciuri</i>		
X96	<i>S. haemolyticus</i>		
X97	<i>S. xylosus</i>		

**Tabla 8.** Resultados de la actividad antimicrobiana de las cepas productoras medida como presencia o ausencia de halos de inhibición/producción de bacteriocinas del ensayo 2.

PRODUCTORAS	INDICADORAS									
Nº cepa/especie	C411 <i>S. aureus</i>	C2663 <i>S. epidermidis</i>	C9459 <i>S. delphini</i>	C137 <i>L. monocytogenes</i>	C2709 <i>S. haemolyticus</i>	C157 <i>M. luteus</i>	C9980 <i>S. lugdunensis</i>	C9927 <i>S. lugdunensis</i>	C8189 <i>S.pseudintermedius</i>	C2912 <i>S. pseudintermedius</i>
<b>X99</b> <i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X100</b> <i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X106</b> <i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X107</b> <i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X108</b> <i>S. sciuri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X111</b> <i>S. nepalensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X114</b> <i>S. arlettae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X117</b> <i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X98</b> <i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X125</b> <i>S. arlettae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X101</b> <i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X118</b> <i>S. warneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X104</b> <i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X110</b> <i>S. sciuri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X96</b> <i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>X97</b> <i>S. xylosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Leyenda** (grado de producción de bacteriocinas):  
 ++ = Producción alta  
 + = Producción baja  
 - = Producción nula



**Figura 16.** Placa con bacteria indicadora C411 (*S. aureus*) donde se observa la ausencia total de halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

#### **4.3. Ensayo 3 en medio sólido. *S. delphini* como microorganismo indicador y *S. pseudintermedius* como especie productora**

Una vez analizados los resultados obtenidos en estos dos primeros ensayos, y habiendo observado que la especie *S. delphini* (Tabla 6; cepa C9459) podría ser un buen microorganismo para ser empleado como indicador en futuros ensayos, se decidió llevar a cabo este experimento incluyendo 11 cepas de *S. delphini* de la colección de la UR procedentes de la mucosa nasal de asnos sanos originarios de Túnez [5].

Como cepas productoras se mantuvieron las 11 cepas del ensayo 1, todas de la especie *S. pseudintermedius* salvo una *S. lugdunensis*. Se incluyeron también otras dos cepas *S. pseudintermedius* aisladas de asnos (C4473 y C4471) y otras dos *S. pseudintermedius* (C8478 y C8479) aisladas de perros sanos y presumiblemente zoonóticas.

La Tabla 9 muestra las cepas empleadas en este ensayo, tanto como productoras como indicadoras de actividad antimicrobiana.

**Tabla 9.** Número de cepa y especie de las diferentes cepas productoras e indicadoras correspondientes al ensayo 3.

PRODUCTORAS		INDICADORAS	
Nº cepa	Especie	Nº cepa	Especie
<b>C8187</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C4464</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C2912</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C4751</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C3930</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C5672</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C3007</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C5674</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C9954</b>	<i>S. lugdunensis</i>	<b>C4469</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C8189</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C4459</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C8188</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C4458</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C8368</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C4461</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C2915</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C4465</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C2382</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C4755</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C3917</b>	<i>S. pseudintermedius</i>	<b>C4752</b>	<i>S. delphini</i>
<b>C4473</b>	<i>S. pseudintermedius</i>		
<b>C4471</b>	<i>S. pseudintermedius</i>		
<b>C8478</b>	<i>S. pseudintermedius</i>		
<b>C8479</b>	<i>S. pseudintermedius</i>		

Se procedió del mismo modo que en los ensayos anteriores realizando los diferentes “spot in the lawn” de cada cepa indicadora en diferentes días. En la Tabla 10 se muestran los resultados en referencia a la producción de bacteriocinas.

**Tabla 10.** Resultados de la actividad antimicrobiana de las cepas productoras medida como presencia o ausencia de halos de inhibición/producción de bacteriocinas del ensayo 3.

PRODUCTORAS	INDICADORAS										
Nº cepa/especie	C4464 <i>S. delphini</i>	C4751 <i>S. delphini</i>	C5672 <i>S. delphini</i>	C5674 <i>S. delphini</i>	C4469 <i>S. delphini</i>	C4459 <i>S. delphini</i>	C4458 <i>S. delphini</i>	C4461 <i>S. delphini</i>	C4465 <i>S. delphini</i>	C4755 <i>S. delphini</i>	C4752 <i>S. delphini</i>
<b>C8187</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C2912</b> <i>S. pseudintermedius</i>	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-
<b>C3930</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C3007</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C9954</b> <i>S. lugdunensis</i>	-	++	+	+/-	++	++	+	+	+/-	+/-	-
<b>C8189</b> <i>S. pseudintermedius</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<b>C8188</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C8368</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C2915</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C2382</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C3917</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C4473</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C4471</b> <i>S. pseudintermedius</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>C8478</b> <i>S. pseudintermedius</i>	+++	+++	+++	+++							
<b>C8479</b> <i>S. pseudintermedius</i>	+++	+++	+++	+++							

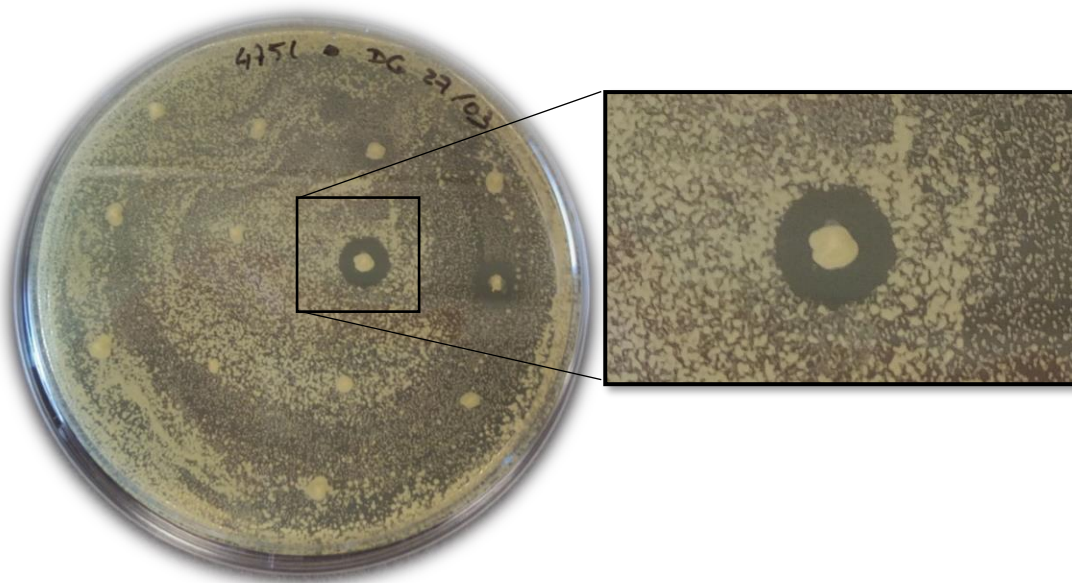
**Leyenda** (grado de producción de bacteriocinas):

- +++ = Producción muy alta
- ++ = Producción alta
- +
- +/- = Producción muy baja
- = Producción nula

En este tercer ensayo de detección de la actividad antimicrobiana en medio sólido mediante la técnica “spot in the lawn”, se obtuvieron resultados positivos para cuatro de las cepas de *S. pseudintermedius* y la cepa de *S. lugdunensis*. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición (en mm) de estas cinco cepas. Los resultados están indicados en la Tabla 11. El grado de producción de bacteriocinas se consideró en función del tamaño del Ø.

**Tabla 11.** Diámetros de los halos de inhibición de las cepas que han ofrecido producción respecto a las cepas indicadoras testadas en el ensayo 3 (las casillas marcadas con “-” representan halos tan pequeños que no se pudieron medir con precisión).

PRODUCTORAS	Diámetro de los halos de inhibición de las cepas productoras (mm)										
	INDICADORAS										
Nº cepa	C4464	C4751	C5672	C5674	C4469	C4459	C4458	C4461	C4465	C4755	C4752
<b>C2912</b>	-	-	-	3,5	-	-	-	-	-	-	-
<b>C9954</b>	-	5	3,5	-	5	4	3	3	-	-	-
<b>C8189</b>	4,5	7	6,5	6	7,5	6	6	12	6	8	5,5
<b>C8478</b>	8	7,5	6	7							
<b>C8479</b>	10	8	7,5	7,5							



**Figura 17.** Placa con bacteria indicadora C4751 (*S. delphini*) con producción en las cepas C2912, C8189 (*S. pseudintermedius*) y C9954 (*S. lugdunensis*). Ampliación del halo inhibitorio de la cepa productora C8189 con Ø = 7 mm.

#### 4.4. Ensayo 4 en medio sólido. *S. delphini* como microorganismo productor y *S. pseudintermedius* y *S. aureus* como indicadoras

Tras observar que la especie *S. delphini* es una buena bacteria indicadora, especialmente para testar la producción de actividad de cepas de la especie *S. pseudintermedius*, se planteó este nuevo ensayo para analizar *S. delphini* como posible especie productora de sustancias antimicrobianas. La selección de las cinco cepas (tres *S. pseudintermedius* y dos *S. aureus*) empleadas como indicadoras en

este ensayo, se realizó en función de los resultados observados en los ensayos anteriores.

**Tabla 12.** Número de cepa y especie de las diferentes cepas productoras e indicadoras correspondientes al ensayo 4.

PRODUCTORAS		INDICADORAS	
Nº cepa	Especie	Nº cepa	Especie
<b>C4464</b>	<i>S. delphini</i>	<b>C8187</b>	<i>S. pseudointermedius</i>
<b>C4751</b>	<i>S. delphini</i>	<b>C2912</b>	<i>S. pseudointermedius</i>
<b>C5672</b>	<i>S. delphini</i>	<b>C8189</b>	<i>S. pseudointermedius</i>
<b>C5674</b>	<i>S. delphini</i>	<b>C411</b>	<i>S. aureus</i>
<b>C4469</b>	<i>S. delphini</i>	<b>C1570</b>	<i>S. aureus</i>
<b>C4459</b>	<i>S. delphini</i>		
<b>C4458</b>	<i>S. delphini</i>		
<b>C4461</b>	<i>S. delphini</i>		
<b>C4465</b>	<i>S. delphini</i>		
<b>C4755</b>	<i>S. delphini</i>		
<b>C4752</b>	<i>S. delphini</i>		

**Tabla 13.** Resultados de la actividad antimicrobiana de las cepas productoras medida como presencia o ausencia de halos de inhibición/producción de bacteriocinas del ensayo 4.

PRODUCTORAS Nº cepa/especie	INDICADORAS				
	<b>C8187</b> <i>S. pseudointermedius</i>	<b>C2912</b> <i>S. pseudointermedius</i>	<b>C8189</b> <i>S. pseudointermedius</i>	<b>C411</b> <i>S. aureus</i>	<b>C1570</b> <i>S. aureus</i>
<b>C4464</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C4751</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C5672</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C5674</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C4469</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C4459</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C4458</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C4461</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C4465</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C4755</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-
<b>C4752</b> <i>S. delphini</i>	-	-	-	-	-

**Leyenda** (grado de producción de bacteriocinas):

- +++ = Producción muy alta
- ++ = Producción alta
- + = Producción baja
- +/- = Producción muy baja
- = Producción nula



Los ensayos 3 y 4 muestran que *S. delphini* es buena bacteria indicadora ya que se observan halos de inhibición de crecimiento frente a múltiples cepas productoras de la especie *S. pseudintermedius*. Sin embargo, *S. delphini* no produce ningún tipo de sustancia antimicrobiana frente a las cepas indicadoras testadas.

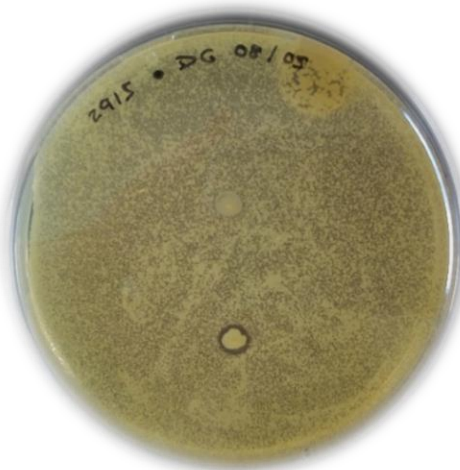
#### 4.5. Ensayo 5 en medio sólido. *S. pseudintermedius* como productor frente a *S. pseudintermedius* como indicador

En los ensayos 1 y 3 anteriores se observa que las cepas *S. pseudintermedius* C8189 y C2912 presentan actividad antimicrobiana de interés, y se plantea llevar a cabo este ensayo donde se testaron varias cepas indicadoras de la especie *S. pseudintermedius* utilizando como productoras las cepas C2912 y C8189. Los resultados se recogen en la Tabla 14 adjunta a continuación:

**Tabla 14.** Resultados de producción de bacteriocinas del ensayo 5 y diámetro, expresado en mm, de cada halo de inhibición generado.

PRODUCTORAS	INDICADORAS						
Nº cepa <i>S. pseudintermedius</i>	C8187	C3007	C3930	C8188	C8368	C2915	C2382
C2912	-	-	-	-	-	-	-
C8189	++	++	+++	+++	++	++	+++
	Ø = 4,5	Ø = 5,5	Ø = 6,5	Ø = 7,0	Ø = 4,0	Ø = 5,0	Ø = 10

**Leyenda** (grado de producción de bacteriocinas):  
 +++ = Producción muy alta  
 ++ = Producción alta  
 - = Producción nula  
 Ø = Diámetro de halo (mm)



**Figura 18.** Placa con indicadora C2915 donde se observa la ausencia de halo en C2912 y la presencia de un halo de inhibición en la posición C8189.

Como indica la Tabla 14 la cepa C8189 presenta una alta producción de bacteriocinas con actividad antimicrobiana frente a todas las cepas indicadoras testadas, a

diferencia de C2912 que fue negativa. En la Tabla 15 se presenta un resumen del espectro de actividad antimicrobiana obtenido con la cepa C8189.

**Tabla 15.** Resumen de los resultados de producción de la cepa C8189 frente a cepas indicadoras de distintas especies del género *Staphylococcus* y otros géneros.

INDICADORAS		Producción de C8189 ( <i>S. pseudintermedius</i> )
Nº cepa	Especie	
C411	<i>S. aureus</i>	+
C2663	<i>S. epidermidis</i>	-
C1570	<i>S. aureus</i>	+
C2709	<i>S. haemolyticus</i>	-
C9459	<i>S. delphini</i>	++
C137	<i>L. monocytogenes</i>	-
C410	<i>E. faecalis</i>	-
C7246	<i>S. aureus</i>	-
C5313	<i>S. aureus</i>	-
C9780	<i>S. sciuri</i>	+
C4464	<i>S. delphini</i>	++
C4751	<i>S. delphini</i>	+++
C5672	<i>S. delphini</i>	+++
C5674	<i>S. delphini</i>	+++
C4469	<i>S. delphini</i>	+++
C4459	<i>S. delphini</i>	+++
C4458	<i>S. delphini</i>	+++
C4461	<i>S. delphini</i>	+++
C4465	<i>S. delphini</i>	+++
C4755	<i>S. delphini</i>	+++
C4752	<i>S. delphini</i>	++
C3468	<i>S. pseudintermedius</i>	+++
C2381	<i>S. pseudintermedius</i>	++
X99	<i>S. haemolyticus</i>	-
X100	<i>S. cohnii</i>	-
X106	<i>S. cohnii</i>	-
X107	<i>S. saprophyticus</i>	-
X108	<i>S. sciuri</i>	-
X111	<i>S. nepalensis</i>	-
X114	<i>S. arlettae</i>	-
X117	<i>S. cohnii</i>	-
X98	<i>S. epidermidis</i>	-
X125	<i>S. arlettae</i>	-
X101	<i>S. haemolyticus</i>	-
X118	<i>S. warneri</i>	-
X104	<i>S. epidermidis</i>	-
X110	<i>S. sciuri</i>	-
X96	<i>S. haemolyticus</i>	-
X97	<i>S. xylosus</i>	-
C8187	<i>S. pseudintermedius</i>	++
C3007	<i>S. pseudintermedius</i>	++
C3930	<i>S. pseudintermedius</i>	+++
C8188	<i>S. pseudintermedius</i>	+++
C8368	<i>S. pseudintermedius</i>	++
C2915	<i>S. pseudintermedius</i>	++
C2382	<i>S. pseudintermedius</i>	+++

#### 4.6. Ensayo 6. Detección de actividad antimicrobiana de la cepa *S. pseudintermedius* C8189 crecida en medio líquido

En los ensayos previos se empleó la técnica de “spot in the lawn” para la detección de producción de sustancias antimicrobianas en medio sólido.

Con la cepa C8189 seleccionada por ser la más productora según los resultados obtenidos en nuestros anteriores ensayos, se realizaron los siguientes experimentos para comprobar si la actividad detectada en medio sólido también lo era cuando la cepa es crecida en medio líquido y si la actividad antibacteriana bacteriocina es secretada al medio extracelular o, por el contrario, permanece en el interior de la célula.

##### **Método de centrifugación:**

Para estudiar la producción en medio líquido de la cepa C8189, se inocularon 20 µl de suspensión de sobrenadante (sin hervir, hervido 1 min y hervido 5 min). Como controles se incluyeron inoculaciones por picadura de las cepas *S. pseudintermedius* C8189 y C2912. Como cepas indicadoras se emplearon dos cepas *S. delphini* (C5674 y C4469) y dos cepas *S. pseudintermedius* (C2381, C3468).

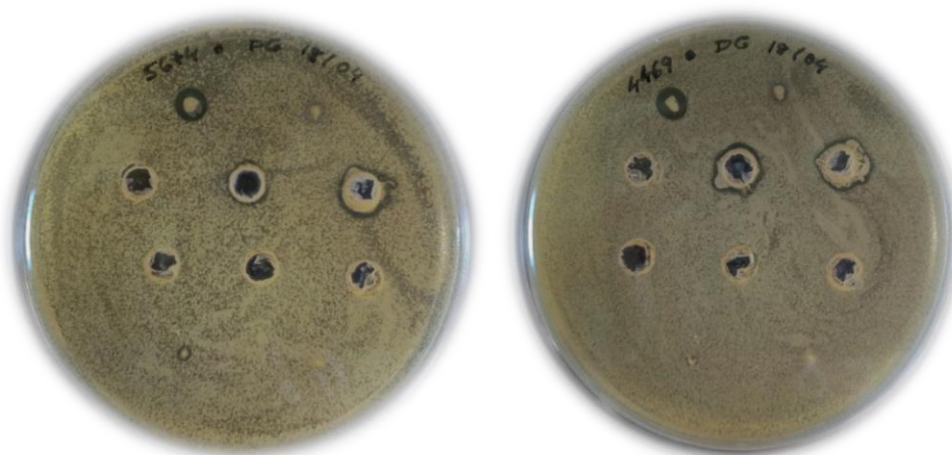
Las alícuotas añadidas en las placas indicadoras C5674 y C4469 eran de sobrenadante de la cepa C8189 tras la centrifugación mientras que las alícuotas de las placas indicadoras C2381 y C3468 procedían del sobrenadante de la cepa C9954 (*S. lugdunensis*).

**Tabla 16.** Resultados de producción de bacteriocinas de la cepa C8189 utilizando el método de centrifugación.

PRODUCTORAS	INDICADORAS			
Cepas/Inóculos	C5674 <i>S. delphini</i>	C4469 <i>S. delphini</i>	C2381 <i>S. pseudintermedius</i>	C3468 <i>S. pseudintermedius</i>
<b>C2912</b> <i>S. pseudintermedius</i>	+/-	+	+	+/-
<b>C8189</b> <i>S. pseudintermedius</i>	+++	+++	+++	+++
Sin hervir	++	++	-	-
Hervido 1 min	-	-	-	-
Hervido 5 min	-	-	-	-

##### **Leyenda** (grado de producción de bacteriocinas):

- +++ = Producción muy alta
- ++ = Producción alta
- +
- +/- = Producción muy baja
- = Producción nula



**Figura 19.** Resultados de las placas indicadoras C5674 (izda.) y C4469 (dcha.) usando centrifugación.

Tal y como indican la Tabla 16 y las imágenes de la Figura 19, se observan halos de inhibición alrededor de los inóculos por picadura y alrededor de los pocillos con inóculo sin hervir.

En todos los casos, no se observan halos en condiciones de hervido respaldando la idea de que las bacteriocinas se desnaturalizan a altas temperaturas o bien que no se secretan al medio extracelular.

#### Método de liofilización:

Se estudió la actividad antibacteriana de discos cargados con liofilizados de cultivos de la cepa C8189 (centrifugado, hervido y filtrado). Como cepas indicadoras se emplearon dos *S. delphini* (C5674 y C4469) y dos *S. pseudintermedius* (C2381 y C3468).

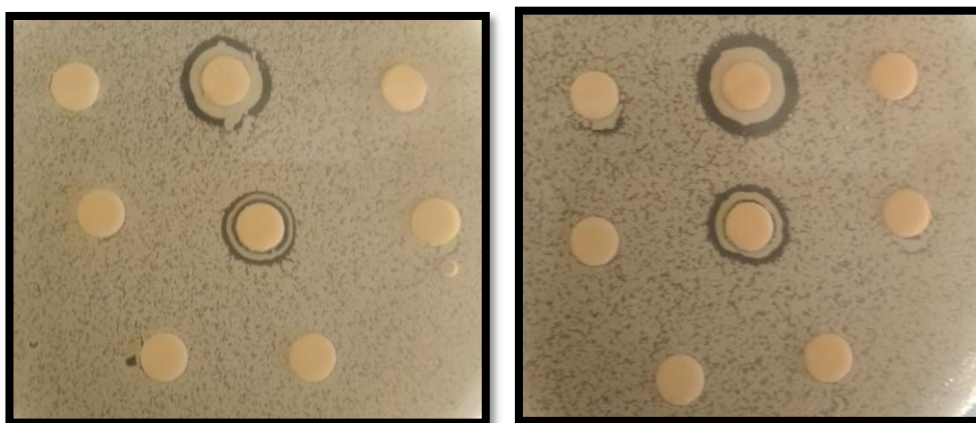
Los discos estériles depositados en las placas de indicador *S. delphini* contenían diferentes alícuotas de la cepa productora C8189.

**Tabla 17.** Resultados de producción de bacteriocinas de la cepa C8189 utilizando el método de liofilización.

PRODUCTORAS		INDICADORAS			
Nº cepa/especie	Alícuota en disco	C5674 <i>S. delphini</i>	C4469 <i>S. delphini</i>	C2381 <i>S. pseudintermedius</i>	C3468 <i>S. pseudintermedius</i>
C8189 <i>S. pseudintermedius</i>	Hervido	-	-	-	-
	Centrifugado	++	++	+	++
	Filtrado	-	-	-	-

**Leyenda** (grado de producción de bacteriocinas):

- ++ = Producción alta
- +
- = Producción nula



**Figura 20.** Ampliación de las placas indicadoras C5674 (izda.) y C4469 (dcha.) utilizando liofilización.

De acuerdo a los resultados expuestos en la Tabla 17 y las imágenes recogidas en la Figura 20, únicamente se observan halos de inhibición alrededor de los discos cargados con 25µl de liofilizado del cultivo centrifugado.

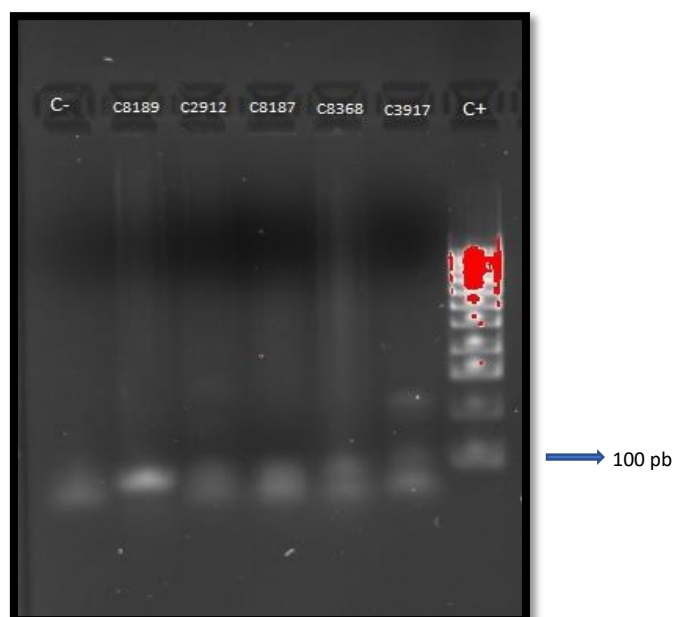
En el resto de discos no se observa ningún halo de inhibición por lo que se deduce que en el sobrenadante continúa habiendo restos de bacterias productoras y, como consecuencia, producción de bacteriocinas. Las condiciones de hervido mantienen la idea de la desnaturalización proteica y las condiciones de filtrado dejan prever que la bacteriocina no se secreta al medio extracelular ya que mediante esta condición se asegura la eliminación completa de bacteria en el sobrenadante.

#### **Extracción de ADN, PCR y electroforesis en gel de agarosa:**

Tras la extracción de ADN de las cinco cepas *S. pseudintermedius* seleccionadas, dos de ellas fuertemente productoras y tres no productoras, se llevó a cabo la PCR usando los cebadores diseñados para la amplificación de un fragmento de 70 pb del gen *bacSp222*. Una vez preparado el gel con las cinco cepas incluidas así como un marcador de masa molecular (C+) y un control negativo (C-) se realizó la electroforesis obteniendo los resultados mediante el captador de imágenes.

**Tabla 18.** Distribución de las cepas de la especie *S. pseudintermedius* y los controles positivo y negativo en los pocillos del gel de agarosa.

Nº pocillo	Nº registro/Control
1	<b>C-</b>
2	<b>C8189</b> <i>S. pseudintermedius</i>
3	<b>C2912</b> <i>S. pseudintermedius</i>
4	<b>C8187</b> <i>S. pseudintermedius</i>
5	<b>C8368</b> <i>S. pseudintermedius</i>
6	<b>C3917</b> <i>S. pseudintermedius</i>
7	<b>C+</b>



**Figura 21.** Captura obtenida mediante Image Store 5000 tras la electroforesis en gel de agarosa de cinco cepas de la especie *S. pseudintermedius* y los controles utilizados.

La Figura 21 muestra varias bandas en el carril con marcador de masa molecular (C+) y cada una de ellas representa 100 pb. Se observa una banda en la cepa C8189 de menor tamaño que la banda correspondiente a 100 pb del marcador C+ lo que podría significar la presencia del fragmento de 70 pb del gen de interés. No obstante, para poder verificar estos resultados se decidió secuenciar en el futuro próximo dicho fragmento de PCR para determinar si corresponde al gen *bacSp222* asociado a una bacteriocina.

#### **MALDI-TOF:**

Se verificó mediante MALDI-TOF la cepa C9151 (*S. lugdunensis*) ya que su crecimiento se asemejaba al de un bacilo y no a un estafilococo. La re-identificación reveló que se trataba, en efecto, de *S. lugdunensis*.

## 5. DISCUSIÓN

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica ha supuesto una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Los antibióticos han salvado millones de vidas, y además han desatado toda una revolución en la medicina. Sin embargo, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana a los antibióticos, que se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie.

La evolución de las bacterias es darwiniana: frente a los cambios (antibióticos en este caso), sobreviven las que mejor se adaptan. En las bacterias la adaptabilidad se debe a su plasticidad genética y su rápida replicación. El progreso de la resistencia bacteriana a los antibióticos es inevitable; pero se puede retrasar. La resistencia puede ser reversible o casi cuando es rara; si es común, difícilmente; en un mundo globalizado es más difícil controlarla, se trata de una crisis global frente a la que no son suficientes medidas nacionales o locales [14].

Una de las especies más destacadas, *S. pseudintermedius* (diferenciado de *S. intermedius* en 2005), coloniza la piel y la superficie de las mucosas de hasta el 90% de los perros sanos. Clínicamente, *S. pseudintermedius* es la causa más común de pioderma y otitis externa, la segunda causa más común de infecciones del tracto urinario, y está frecuentemente implicado en infecciones nosocomiales en perros. La alta frecuencia de estas infecciones ha reclamado la atención de veterinarios quienes resaltan la importancia de la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. Actualmente, la resistencia a la meticilina, que está emergiendo rápidamente entre *S. pseudintermedius* en perros y es común entre *S. aureus* en humanos, es una grave amenaza para la eficacia de los antibióticos más utilizados, los  $\beta$ -lactámicos [15].

Así mismo, las dos últimas décadas han sido testigo de dos cambios claros en la epidemiología de las infecciones causadas por *S. aureus*: primero, un número creciente de infecciones asociadas al cuidado de la salud como la endocarditis infecciosa y, en segundo lugar, el incremento de infecciones en la piel y tejidos blandos impulsadas por cepas con ciertos factores de virulencia y resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos [16].

Por otro lado, *S. delphini*, perteneciente al grupo de *S. intermedius* (SIG), ha sido aislado de múltiples animales como vacas, caballos, asnos, visones, etc y se ha detectado, sobre todo, como un patógeno potencial en la familia de los équidos. Todavía existe muy poco conocimiento acerca de esta especie debido a su reciente descubrimiento por lo que se han realizado estudios de comparación genómica del SIG (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini*). El genoma central del SIG está altamente conservado con una identidad media de nucleótidos (ANI) entre las tres especies del 93.61% destacando la estrecha relación de las especies SIG. Sin embargo, se han identificado variaciones considerables en el contenido de

elementos genéticos móviles, proteínas asociadas a la pared celular y transportadores de hierro y azúcar, que reflejan los distintos nichos ecológicos habitados por las tres especies del grupo [17].

El estudio completo se ha basado en la realización de seis ensayos de manera consecutiva donde el objetivo principal ha consistido en el descubrimiento de nuevas cepas productoras frente a múltiples indicadores del mismo género e incluso de la misma especie.

Las bacteriocinas se han postulado como una alternativa a los antibióticos en el tratamiento y profilaxis de enfermedades infecciosas, tanto en el ámbito humano como animal [11]. Además, las bacterias productoras de bacteriocinas pueden modular la colonización por ciertas bacterias sensibles a dichas bacteriocinas en determinados nichos ecológicos de animales o humanos. Este es el caso de la lugdunina, bacteriocina de síntesis no ribosomal producida por *S. lugdunensis*, que podría modular la colonización por *S. aureus* y SARM en individuos sanos, aspecto de gran interés en salud pública [17], y que podría explicar porque hay individuos que nunca se colonizan por este microorganismo y otros sí que lo hacen.

En primer lugar, en el ensayo 1, once cepas del género *Staphylococcus* (10 *S. pseudintermedius* y un *S. lugdunensis*, del que ya se conocía mediante un estudio paralelo su alta producción de bacteriocinas frente a distintas especies de *Staphylococcus*) fueron testados para ver si producían sustancias antimicrobianas frente a 10 bacterias indicadoras de diferentes géneros y especies. Mediante la técnica de “spot in the lawn” se evidenció que había dos cepas de *S. pseudintermedius* productoras de sustancias antimicrobianas, potencialmente bacteriocinas (C2912 y C8189), además de la cepa *S. lugdunensis* C9954. El caso de C9954 no generó interés pues ya se había realizado un estudio paralelo previo con esta cepa y simplemente se empleó para corroborar que los diferentes screenings se estaban realizando correctamente (control). Sin embargo, las otras dos cepas, reclamaron nuestra atención. En concreto, la cepa C8189 había desarrollado halos de inhibición en diferentes especies de *Staphylococcus* tanto en SCoP (*S. aureus* y *S. delphini*) como SCoN (en *S. sciuri*), destacando su alta producción antimicrobiana frente a *S. delphini*.

Durante todo el proceso que conllevó realizar el ensayo 1, la cepa C9151 (*S. lugdunensis*), que finalmente no participaría como productora ni indicadora porque provenía al igual que la cepa C9954 de un estudio paralelo, se verificó por MALDI-TOF debido a un crecimiento con morfología inusual. Sin embargo, la técnica la re-identificó como *S. lugdunensis*.

Posteriormente, fue nuestro interés determinar si diferentes especies de SCoN podrían ser productoras de sustancias antimicrobianas, y para ello se llevó a cabo el ensayo 2. En este caso, como microorganismos potencialmente productores se empleó una colección de 16 cepas de SCoN y se testó frente a bacterias indicadoras tanto de SCoN como de SCoP e incluso especies de otros géneros como *Listeria*



*monocytogenes* y *Micrococcus luteus*. Los resultados obtenidos mediante la técnica de “spot in the lawn” fueron negativos para todas las cepas potencialmente productoras, es decir, en ninguna placa Petri con indicador se observó halos de inhibición del crecimiento microbiano. Este suceso conllevó al abandono de dicho ensayo y se decidió continuar el estudio considerando los resultados favorables del ensayo 1.

Debido a que el crecimiento de *S. delphini* había sido inhibido fuertemente por una cepa de la especie *S. pseudintermedius* (C8189), se propuso un ensayo 3 donde se seleccionaron 11 cepas de *S. delphini* como indicadoras y 15 cepas de *S. pseudintermedius* como potencialmente productoras. Las cepas indicadoras de *S. delphini* procedían de la mucosa nasal de asnos sanos originarios de Túnez, pertenecientes a 6 líneas genéticas diferentes obtenidas por multilocus-sequence-typing [5]. Las cepas potencialmente productoras correspondían a las 11 cepas del ensayo 1 más otras dos de la especie *S. pseudintermedius* aisladas de asnos (C4473 y C4471) así como dos *S. pseudintermedius* aisladas de perros sanos y presumiblemente zoonóticas (C8478 y C8479). Los resultados obtenidos confirmaron la gran producción de bacteriocinas que genera la cepa C8189 cuando se enfrenta a un medio de cultivo con cualquier cepa de la especie *S. delphini*. Además, se calcularon los diámetros de los halos de todas las cepas productoras relacionando el tamaño de éstos con el grado de producción obteniéndose diámetros de hasta 12 mm en C8189. En este ensayo se evidenció que había otras dos cepas de *S. pseudintermedius* con una buena producción de bacteriocinas frente a *S. delphini* (C8478 y C8479), y que procedían de perros, y posiblemente de origen zoonótico.

Como las especies de *S. delphini* habían ofrecido resultados muy interesantes se propuso realizar un ensayo 4 que consistió en testar éstas como productoras frente a cinco indicadoras seleccionadas, tres *S. pseudintermedius* y dos *S. aureus*, comprobando finalmente su nula actividad de producción antimicrobiana.

Un quinto ensayo se llevó a cabo a partir de los resultados obtenidos en los ensayos 1 y 3. Las cepas *S. pseudintermedius* C2912 y C8189 se testaron como productoras frente a varias cepas indicadoras de la misma especie *S. pseudintermedius*, calculando también los diámetros de los halos de inhibición. En este caso, la cepa C2912 no dio producción de sustancias antimicrobianas frente a las bacterias indicadoras testadas. Sin embargo, en la cepa C8189 se observaron grandes halos inhibitorios para todas las indicadoras testadas. Esto conllevó a la realización de una tabla resumen de la producción de la cepa C8189 destacando su gran producción de bacteriocinas con una excelente actividad frente a cepas de las especies *S. delphini* y *S. pseudintermedius*.

A continuación, se planteó y desarrolló un ensayo 6 donde se pretendía detectar la actividad antimicrobiana de la cepa C8189, pero, en este caso, en medio líquido. Dicha cepa fue seleccionada por haber sido la más productora durante todo el trabajo y el objetivo era comprobar si su actividad antibacteriana también estaba

presente en medio líquido y si ésta era secretada al medio extracelular o, sin embargo, permanecía en el interior de la célula. Para ello, se llevaron a cabo varias metodologías: en primer lugar, tras la centrifugación, se inocularon alícuotas de sobrenadante sin hervir, hervido 1 min y hervido 5 min de la cepa C8189 sobre indicadoras de especies *S. delphini* y *S. pseudintermedius*. Además, se incluyeron inoculaciones por picadura tanto de la cepa C8189 como de C2912 (*S. pseudintermedius*) como controles. Se observaron halos de inhibición alrededor de los inóculos por picadura y también, alrededor de los pocillos con inóculo sin hervir. En el resto de casos, no se observaron halos en condiciones de hervido por lo que se concluyó que las bacteriocinas se desnaturalizaban a altas temperaturas o bien no eran secretados al medio. Después, se comprobó la actividad antimicrobiana de discos cargados con liofilizados de cultivos de la cepa C8189 que habían sido sometidos a centrifugado, hervido y filtrado previamente. Se testó frente a las mismas indicadoras *S. delphini* y *S. pseudintermedius* (en estas solo como inóculos por picadura de C8189) empleadas en el primer método. Se detectó actividad antimicrobiana sólo cuando el extracto testado correspondía al centrifugado y liofilizado lo cual sugiere que el sobrenadante podía presentar un cierto número de bacterias que, por tanto, seguían produciendo bacteriocinas en el medio sólido. En las alícuotas hervidas no hubo detección de halos de inhibición por el presunto motivo de la desnaturalización proteica y en las alícuotas filtradas tampoco hubo producción debido a que el filtro no permitía el paso de ninguna bacteria deduciendo finalmente que las bacteriocinas no eran secretadas al medio extracelular.

La extracción de ADN y la PCR de cinco cepas *S. pseudintermedius* seleccionadas, entre ellas, C8189, se llevó a cabo para la detección de la amplificación de un fragmento de 70 pb del gen *bacSp222*, en el caso de que se expresara dicho gen en alguna de las cepas.

La posterior electroforesis mostró mediante la ayuda de un marcador de masa molecular (de 100 a 1000 pb) la posible presencia del gen de interés en alguna de las cepas sometidas a PCR. En el pocillo de gel correspondiente a la cepa C8189 apareció una banda por debajo del nivel de la banda 100 pb del C+, lo que podría significar la existencia del amplicón de 70 pb del gen. Esto exige la secuenciación de dicho fragmento de PCR que se llevará a cabo en el futuro próximo.

Finalmente, la cepa *S. pseudintermedius* C8189 (sensible a meticilina y aislada de una muestra clínica humana y perteneciente a la línea genética ST241) puede ser considerada como una cepa de gran interés en términos de producción de sustancias con actividad antimicrobiana, por su alta actividad frente a cepas de SCoP de las especies *S. delphini* y *S. pseudintermedius*. Hay otras dos cepas de *S. pseudintermedius* (de origen canino) que también podrían tener interés para su posterior caracterización. Futuros trabajos permitirán determinar el papel que pueden desempeñar estas bacterias productoras de bacteriocinas en la ecología de *Staphylococcus coagulans* positivos en el ámbito animal y la eficacia que pueden

tener estas sustancias para el control de infecciones en animales o para controlar su transferencia a humanos en eventos zoonóticos.

## 6. CONCLUSIONES

- 1) Se analiza la producción de sustancias antimicrobianas a partir de 43 cepas de *Staphylococcus*, tanto SCoP (*S. pseudintermedius* y *S. delphini*) como SCoN (9 especies diferentes) frente a 30 bacterias indicadoras de diferentes géneros/especies bacterianos y fenotipos de resistencia a antibióticos.
- 2) Se evidencia la producción de sustancias antimicrobianas, potencialmente bacteriocinas, en 4 de las 14 cepas de *S. pseudintermedius* analizadas, siendo la cepa C8189 la que presenta un espectro de actividad inhibitoria más amplio.
- 3) La bacteriocina producida por la cepa *S. pseudintermedius* C8189 tiene una actividad inhibitoria muy elevada frente a diversas cepas de las especies *S. delphini* y *S. pseudintermedius*, obtenidas de diferentes orígenes y de distintas líneas genéticas. Asimismo, también presenta actividad inhibitoria frente a algunas cepas de *S. aureus* y de *S. sciuri*.
- 4) No se detecta producción de actividades antimicrobianas a partir de cepas de distintas especies de SCoN (con la excepción de *S. lugdunensis*) o de *S. delphini*.
- 5) Las actividades antimicrobianas producidas por *S. pseudintermedius* son solamente evidentes cuando se analiza dicha producción en medio sólido, pero no cuando los ensayos se realizan en medio líquido. Esto sugiere complejos procesos de regulación.
- 6) La actividad antimicrobiana producida por C8189 no se detecta en el extracto filtrado y concentrado por liofilización, lo cual sugiere que no se secreta al medio extracelular.
- 7) Es posible que la cepa C8189 contenga el gen *bacSp222*, al haberse detectado por PCR un producto compatible con dicho gen, aunque debe ser corroborado mediante secuenciación.
- 8) En este estudio se ha detectado una cepa de *S. pseudintermedius* C8189 que puede tener un interés biotecnológico para el control de la colonización/infección por bacterias SCoP en humanos y animales. Futuros estudios permitirán avanzar en la caracterización de la bacteriocina de esta cepa y en su utilidad en el ámbito biomédico y agroalimentario.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Famousinventors.org. (2018). *Alexander Fleming | Biography, Inventions and Facts*. [online] Available at: <https://www.famousinventors.org/alexander-fleming>
- [2] Alberto Varela San Pedro. Diversidad de especies de *Staphylococcus* y caracterización de fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos en muestras nasotraqueales de perdiz roja. Máster en Química y Biotecnología (2015/2016).
- [3] Parte, A. (2018). *Staphylococcus*. [online] Bacterio.net. Available at: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>
- [4] Chessa, D., Ganau, G. and Mazzarello, V. (2015). An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(06), p.547.
- [5] Gharsa, H., Slama, K., Gómez-Sanz, E., Gómez, P., Klibi, N., Zarazaga, M., Boudabous, A. and Torres, C. (2014). Characterisation of nasal *Staphylococcus delphini* and *Staphylococcus pseudointermedius* isolates from healthy donkeys in Tunisia. *Equine Veterinary Journal*, 47(4), pp.463-466.
- [6] Lozano, C., Rezusta, A., Ferrer, I., Pérez-Laguna, V., Zarazaga, M., Ruiz-Ripa, L., Revillo, MJ., and Torres, C. (2017). *Staphylococcus pseudintermedius* human infection cases in Spain: Dog-to-Human Transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(4), pp.268-270.
- [7] Gómez-Sanz, E., Torres, C., Ceballos, S., Lozano, C. and Zarazaga, M. (2013). Clonal dynamics of nasal *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in dog-owning household members. Detection of MSSA ST398. *PLoS ONE*, 8(7), p.e69337.
- [8] Es.wikipedia.org. (2018). *Staphylococcus aureus*. [online] Available at: [https://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus\\_aureus](https://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus)
- [9] Es.wikipedia.org. (2018). *Nisina*. [online] Available at: <https://es.wikipedia.org/wiki/Nisina>
- [10] Diep, D., Straume, D., Kjos, M., Torres, C. and Nes, I. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8), pp.1562-1574.
- [11] Ahmad, V., Khan, M., Jamal, Q., Alzohairy, M., Al Karaawi, M. and Siddiqui, M. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), pp.1-11.
- [12] Zipperer, A., Konnerth, M., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., Burian, M., Schilling, N., Slavetinsky, C., Marschal, M., Willmann, M., Kalbacher, H., Schitteck, B., Brötz-Oesterhelt, H., Grond, S., Peschel, A. and Krismer, B. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*, 535(7613), pp.511-516.

- [13] En.wikipedia.org. (2018). *Lugdunin*. [online] Available at: <https://en.wikipedia.org/wiki/Lugdunin>
- [14] Wladyka, B., Piejko, M., Bzowska, M., Pieta, P., Krzysik, M., Mazurek, Ł., Guevara-Lora, I., Bukowski, M., Sabat, A., Friedrich, A., Bonar, E., Międzobrodzki, J., Dubin, A. and Mak, P. (2015). A peptide factor secreted by *Staphylococcus pseudintermedius* exhibits properties of both bacteriocins and virulence factors. *Scientific Reports*, 5(1).
- [15] Croxatto, A., Prod'hom, G. and Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), pp.380-407.
- [16] Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), pp.692-699.
- [17] Priyantha, R., Gaunt, MC., Rubin, JE. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* colonizing healthy dogs in Saskatoon, Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 57(1), pp.65-69.
- [18] Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp.603–661.
- [19] Ben Zakour, N., Beatson, S., van den Broek, A., Thoday, K. and Fitzgerald, J. (2012). Comparative genomics of the *Staphylococcus intermedius* Group of animal pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, pp.44.